

**BEDEUTUNG DER SERUM
ALPHA-FETOPROTEINBESTIMMUNG IN DER
DIAGNOSTIK UND VERLAUFSBEURTEILUNG DES
PRIMÄREN LEBERKARZINOMS UND
LEBERERKRANKUNGEN
(ERFAHRUNGEN MIT EINEM EIGENEN
RADIOIMMUNOASSAY)**

Ulrich Schmalhorst

1976

Aus dem Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Knedel

BEDEUTUNG DER SERUM ALPHA-FETOPROTEINBESTIMMUNG IN DER DIAG-
NOSTIK UND VERLAUFSBEURTEILUNG DES PRIMÄREN LEBERKARZINOMS
UND LEBERERKRANKUNGEN

(ERFAHRUNGEN MIT EINEM EIGENEN RADIOIMMUNOASSAY)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ulrich Schmalhorst

aus Bielefeld

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Fateh - Moghadam

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Knedel

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.1976



Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	<u>EINLEITUNG</u>	3
2.	<u>ABRIß DER BISHERIGEN FOR - SCHUNG SERGEBNISSE UND KLI - NISCHE ANWENDUNGS GEBIETE</u>	4
2.1	ALLGEMEINE ÜBERSICHT	4
2.2	VORKOMMEN UND FUNKTION DES AFP	4
2.3	EIGENSCHAFTEN	7
2.4	NACHWEISMETHODEN	8
2.5	KLINISCHE ANWENDUNGS GEBIETE	9
3.	<u>METHODIK</u>	9
3.1	EIWEIßBESTIMMUNG	9
3.2	CAF - ELEKTROPHORESE	9
3.3	DOPPELGELDIFFUSION NACH OUCHTERLONY	9
3.4	EINFACHE RADIALE IMMUNDIFFUSION	9
3.5	SEMIQUANTITATIVER ANTIKÖRPER-TITER-VERGLEICH	10
3.6	IMMUNELEKTROPHORESE	11
3.7	PRÄPARATIVE ELEKTROPHORESE MIT KARTONPAPIER ALS TRÄGERMATERIAL	12
3.8	SÄULENCHROMATOGRAPHIE	13
3.8.1	<u>Gelfiltration</u>	13
3.8.2	<u>Cyano-Bromid aktivierte Sepharose</u>	14
3.8.2.1	Prinzip der Methode	14
3.8.2.2	Durchführung der Methode	14
3.8.3	<u>DEAE -Cellulose -Ionenaustauscherchromatographie</u>	15
3.9	KONZENTRIERUNG	16
3.10	ZENTRIFUGATION	16
3.11	LYOPHILISIERUNG	17
3.12	HERSTELLUNG DES ANTISERUMS	17
3.12.1	<u>Immunisierung</u>	17
3.12.2	<u>Reinigung des Immunserums</u>	18
3.13	RADIOIMMUNOASSAY	19
3.13.1	<u>Markierung des Antigens</u>	19
3.13.2	<u>Austestung des ersten Antikörpers</u>	20

3.13.3	<u>Standard-Verdrängungskurve-Ansatz</u>	21
3.13.4	<u>Kommerzieller Radioimmunoassay für AFP</u>	22
3.14	RECHNERISCHE AUSWERTEVERFAHREN	23
3.14.1	<u>Markierung</u>	23
3.14.2	<u>Radioimmunoassay</u>	24
3.14.3	<u>Halbwertszeit</u>	25
3.15	STATISTISCHE BERECHNUNGEN	25
4.	<u>M A T E R I A L I E N</u>	26
4.1	VERWENDETE SUBSTANZEN BEI DER HERSTELLUNG DES RIA	26
4.2	UNTERSUCHTES PATIENTENGUT	26
4.2.1	<u>Kontrollgruppe</u>	27
4.2.2	<u>Patienten mit primärem Leberkarzinom</u>	27
4.2.3	<u>Patienten mit Malignomen und sekundärer Leber- beteiligung</u>	28
4.2.4	<u>Patienten mit Leberzirrhose</u>	28
4.2.5	<u>Patienten mit Hepatitis</u>	28
4.2.6	<u>Patienten mit Leber-Echinococcus cysticus-Befall</u>	29
5.	<u>E R G E B N I S S E</u>	29
5.1	ISOLIERUNG DES ALPHA-FETOPROTEINS	29
5.1.1	<u>Kartonelektrophorese</u>	29
5.1.2	<u>Gelfiltration auf Sephadex G 200 und G 100</u>	36
5.1.3	<u>Cyan Bromid aktivierte Sepharose - Chromatographie</u>	40
5.1.4	<u>Physikalisch-chemische Charakterisierung</u>	42
5.2	MONOSPEZIFISCHER ANTIKÖRPER	45
5.3	HERSTELLUNG DES RADIOIMMUNOASSAY	50
5.3.1	<u>Markierung</u>	50
5.3.2	<u>Erste Antikörper-Verdünnungskurven</u>	52
5.3.3	<u>Standard-Verdrängungskurven</u>	55
5.3.4	<u>Kontrollen - Spezifität - Haltbarkeit</u>	58
5.4	ERGEBNISSE DER KLINISCHEN UNTERSUCHUNGEN	61
5.4.1	<u>Normalwerte</u>	61
5.4.2	<u>AFP bei primären Leberzellkarzinomen</u>	62
5.4.3	<u>Sekundäre Lebermetastasen</u>	64
5.4.4	<u>Leberzirrhose</u>	64
5.4.5	<u>AFP-Spiegelveränderungen bei Hepatitiden</u>	66
5.4.6	<u>AFP-Spiegelveränderungen nach partieller Hepatektomie</u>	70

		Seite
6.	<u>D I S K U S S I O N</u>	74
6.1	DISKUSSION DER METHODISCHEN ERGEBNISSE	74
6.2	DISKUSSION ZUM KLINISCHEN TEIL	
7.	<u>Z U S A M M E N F A S S U N G</u>	109
8.	<u>L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S</u>	111
9.	<u>L E B E N S L A U F</u>	132

Die vorliegende Arbeit wurde zum großen Teil an der I. Medizinischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. H. Schwiegk), zum Teil am Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern der Universität München (Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. M. Knedel) durchgeführt.

Für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit in diesen beiden Instituten danke ich Herrn Prof. Dr. H. Schwiegk und Herrn Prof. Dr. M. Knedel.

Für die Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. M. Knedel.

Für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die vielen Anregungen bei der Durchführung und die großzügige Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit bin ich Herrn Priv. Doz. Dr. A. Fateh-Moghadam zu besonders großem Dank verpflichtet.

Herrn Priv. Doz. Dr. R. Lamerz gilt mein herzlicher Dank für seine große Unterstützung und Hilfestellung bei der Durchführung der Arbeit.

Frau Barbara Glueck, Frau A. Brand und Frau v. Stetten danke ich für ihre Unterstützung bei der technischen Durchführung der Laborarbeiten.

1. E I N L E I T U N G

Carcinofetale Antigene, das heißt Proteine, die nach ihrem zeitlich begrenzten Auftreten in der Embryonalzeit erst wieder bei Patienten mit bestimmten Tumoren stark erhöht nachweisbar sind, machen einen großen Anteil der immunologischen Tumorforschung aus. Zu den am frühesten entdeckten und bekanntesten gehört das Alpha-Fetoprotein (AFP). Dieses wird vom Foetus in dessen frühen Entwicklungsperiode und von Plazentastrukturen produziert, und kann nach der Geburt in nur äußerst geringer Konzentration gefunden werden. Da bei primären Leber Zell Carzinomen (PLC) und teratogenetischen Geschwülsten die Serumkonzentration sich um mehr als das Hunderttausendfache erhöhen kann, kommt der AFP-Bestimmung zur Diagnostik und Therapiekontrolle der genannten Tumoren eine besondere Bedeutung zu. Daneben konnten mit der sehr empfindlichen Bestimmungsmethode des Radio Immuno Assay (RIA) weniger ausgeprägte Erhöhungen bei einem gewissen Prozentsatz von Lebererkrankungen wie Leberzirrhose, Hepatitiden und Metastasenlebern nachgewiesen werden.

Nach einem kurzen Abriß der bisher veröffentlichten Forschungsergebnisse über die Bildung, die Eigenschaften und Anwendungsgebiete des AFP wird in der vorliegenden Arbeit von folgenden Ergebnissen berichtet :

1. Isolierung und Charakterisierung des Alpha-Fetoproteins
2. Die Entwicklung eines eigenen Radio Immuno Assay sowie dessen Vergleich mit dem kommerziell erhältlichen Kit.
3. Radioimmunologische Bestimmungen des AFP im Serum von Patienten mit primärem Leber Zell Carzinom zur Feststellung der Wertigkeit der AFP-Testung für Diagnose, Differentialdiagnose und Verlaufsbeobachtungen bei PLC, und deren Bedeutung zur Früherkennung des PLC bei Patienten mit Leberzirrhose.
4. Die Untersuchung des AFP-Spiegels bei nicht malignen Lebererkrankungen wie Leberzirrhose und Hepatitiden zur Feststellung der Diagnose und einer prognostischen Aussagekraft, Korrelationsuntersuchungen mit anderen biochemischen und klinischen Parametern, sowie die Beobachtung von AFP-Veränderungen bei sekundären Lebermetastasen mit Rückschluß auf Reaktionen des Lebergewebes.

5. Die AFP-Bestimmung nach Teilhepatektomie soll in Zusammenhang mit anderen Befunden dazu beitragen, die Abhängigkeit der AFP-Bildung mit der Leberzell-Regeneration zu beweisen, sowie die Halbwertszeit des Alpha-Fetoproteins zu bestimmen.

2. Abriß der bisherigen Forschungsergebnisse und klinische Anwendungsgebiete des Alpha Fetoproteins

2.1 Allgemeine Übersicht

Während bei experimentell induzierten Tumoren die Existenz von tumorspezifischen Antigenen durch zahlreiche Untersuchungen eindeutig belegt ist, konnte bis jetzt für menschliche Tumoren ein im strengen Sinne "tumorspezifisches Antigen" nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden, obwohl bereits HIRZFELD und Mitarb. (54,55) 1929 bzw. 1932 nach diesen gesucht und über die Verwandtschaftsreaktionen zwischen Embryonal- und Krebsgewebe berichtet haben und es in keiner Zeit an entsprechenden Versuchen gefehlt hat. Die weltweiten intensiven Bemühungen verschiedener immunologisch orientierter Arbeitsgruppen führten jedoch zur Entdeckung mehrerer sogenannter "tumorassoziiierter Antigene", d.h. Antigene, die bei Tumorkranken (Tumorgewebe, Serum) in sehr hoher Konzentration und Häufigkeit, bei den Normalpersonen jedoch nur in sehr geringer bzw. nicht nachweisbarer Konzentration vorkommen. Bei den meisten dieser Antigene handelt es sich um Proteine, die in der intrauterinen Entwicklung in fetalen Organen wie z.B. Leber, Magen, Colonschleimhaut und in der Placenta gebildet werden und in der letzten Fetalperiode bzw. nach der Geburt nicht mehr oder in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar sind. Diese werden als karzino-fetale, onkofetale (OFA) oder auch als carcino-embryonale Antigene (CEA) bezeichnet.

Zu den bekanntesten und zur Tumordiagnostik und Therapieverlaufskontrolle bisher bedeutsamsten Antigenen gehören das Alpha Fetoprotein (AFP) und das carcino-embryonale Antigen (CEA), und mit geringerer Bedeutung das Regan-Isoenzym, das Alpha-2-Fetoprotein (α_2 HF) und das Beta-S-Fetoprotein (Übersicht bei LAMERZ und FATEH-MOGHADAM).

Das Alpha-Fetoprotein wurde 1956 von BERGSTRAND und CZAR(21) in fetalem menschlichen Serum als neue Proteinfraction entdeckt. Diese Beobachtung bestätigten 1959 GALDO et al (39), 1965 MASOPUST et al (97) und 2 Jahre später TATARINOV (177) und BURTIN (28). Bei Mäusen mit transplantierbaren Hepatomen fand ABELEV et al (1) als erster dieses embryonale Alpha-Globulin wieder, welches mit dem bei Rindern mit Hepatomen (70) entdeckten identisch war. In der Folge erschienen mit wechselndem Ausmaß weitere Arbeiten, die diese Untersuchungsergebnisse bei Mäusen und Ratten bestätigen konnten. (68, 158, 173, 186).

Die tierexperimentellen Befunde konnten mit der Entdeckung TATARINOV'S 1964 von AFP in menschlichem PLC-Patientenserum (176) in die klinische Forschung mit einbezogen werden. 1971 gelang ABELEV et al (6) der Nachweis des AFP bei Patienten mit malignen Teratoblastomen des Hodens und des Ovars. Eine detaillierte Aufzählung aller Tierspezies, bei denen in- zwischen AFP gefunden wurde, enthält die Übersicht von LAMERZ und FATEH-MOGHADAM (82).

2.2 V o r k o m m e n u n d F u n k t i o n d e s A F P

Gebildet wird das Protein vom Dottersack und der Leber und dem Gastrointestinaltrakt des Feten (44). Die höchste Produktionsrate mit einer Konzentration bis 4 mg/ml im fetalen Serum wird zwischen der 13. und 15. Entwicklungswoche erreicht (43). Gegen Ende der Schwangerschaft fällt der AFP-Spiegel im embryonalen Blut stark ab und ist 2-5 Wochen nach Geburt (159) nur noch mit den empfindlichsten Methoden im Säuglingsblut nachweisbar. Welche Rolle das AFP in den ersten Monaten eines Embryos spielt, konnte noch nicht völlig geklärt werden. Da die Albumin-Synthese zu der AFP-Bildung reziprok verläuft, könnte das AFP dessen Funktion zunächst übernehmen, zumal eine Ähnlichkeit der physikalisch-chemischen Eigenschaften beider besteht (6). Nachgewiesenermaßen vermag AFP Östrogen zu binden, weshalb eine mögliche Schutzfunktion für den Feten gegenüber den mütterlichen Östrogenen angenommen wird (125, 182).

Die Beobachtung, daß AFP-Neutralisation im Tierexperiment durch Verabreichung von Anti-AFP-Serum an schwangere Tiere (166) eine hohe fetale Mortalitätsrate, Dottersackschädigungen und Mißbildungen zur Folge hatte, läßt weitere wichtige Schutzfunktionen des AFP in der Organogenese vermuten

In menschlichen Hepatomzellkulturen (144), in transplantierbaren Mäusehepatomen und Teratokarzinomen (38) und metastasierendem Hepatomgewebe wurde AFP nachgewiesen. Immunofluoreszenzoptisch fand sich in Tumorzellen von Patienten mit primärem Leberzellkarzinom (37, 120, 121, 136, 168), aber auch in normalen Hepatozyten von Erwachsenen.

Die zelluläre Lokalisation des AFP wird wie folgt angegeben: diffus intrazytoplasmatisch bei fetalen Hepatozyten (37, 94) und Hepatomzellen (38), bei letzteren zusätzlich in der Cytoplasmamembran und der perinukleären Zone (120, 121).

Dieselben Autoren beobachteten, daß AFP-positive Zellen ein azidophiles granuläres Cytoplasma mit größeren hyperchromen Kernen aufweisen können.

URIEL und Mitarbeiter fanden durch Zellaффinitätsmessung mit Litium-markierten Östrogenen das AFP autoradiographisch in menschlichem primärem Hepatomgewebe (184) weder in normalen noch in entarteten Leberzellen, sondern in Übergangszellen (kleinen runden bis ovalen Zellen mit elongiertem oder nierenförmigem Nukleolus), welche an der normalen Leberregeneration teilnehmen und 1-2% der gesamten Leberzellpopulation ausmachen. Daher vertreten sie die Hypothese, daß Synthese und Sekretion von AFP nur im Übergangsstadium der Leberzelldifferenzierung auftritt. Auf die Bedeutung dieser neueren Forschungsergebnisse für unsere eigenen Untersuchungsergebnisse wird in der Diskussion Seite 97 eingegangen werden.

NISHIOKA et al. beobachteten in Hepatompräparaten AFP-haltige Zellen gleichmäßig verteilt mit einer Häufigkeit von 20% (120, 121); GOUSSEV und SMITH fanden sie dagegen bei einem Anteil von 5% nahe bei größeren Blutgefäßen und Kapillaren (45, 169). Für die AFP-Konzentration in Hepatom-Geweben ermittelten LEHMANN et al. (86, 92) Werte zwischen 12 und 630 µg/g Feuchtgewicht.

2.3 Eigenschaften

An der Identität des fetalen Alpha-Globulins mit dem tumor-assoziierten α_1 -Protein gibt es nach den heutigen Forschungsergebnissen keinen Zweifel. Sowohl biochemisch als auch immunologisch (49,53,116,147,150) wurden keine Unterschiede zwischen dem AFP von fetalem und Hepatom-Serum bewiesen. Auch das AFP von verschiedenen Spezies (Mensch, Rind, Schwein, Pferd, Hund, Affe, Katze, Schaf, Kaninchen, Ratte und Maus) reagierte in analoger Weise mit Anti-AFP-Immunglobulinen (118, 185).

Elektrophoretisch wandert, wie schon der Name zum Ausdruck bringt, das Protein in der α_1 -Bande. Das Molekulargewicht dieses sauren Glykoproteids wird mit 61 000 - 75 000 angegeben (Lit. S. 80), der Sedimentationskoeffizient zwischen 4,5 und 5,5 S (43,99,115,116). Der molare Extinktionskoeffizient bei 278 nm beträgt $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 5,3$ (Fetus) und 5,26 (Hepatom) (53), der isoelektrische Punkt 4,7 (9). Die elektrische Mobilität errechnete MASOPUST (99) mit $-6,08 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$.

Die Untersuchung der biochemischen Struktur erbrachte folgende Ergebnisse: Der Kohlenhydratgehalt (Mannose, Galaktose, Glukose und Sialinsäure) (53) soll zwischen 3 und 4,3 % betragen. RUOSLAHTI (148) berechnete das Verhältnis Hexose-Hexosamin-Sialinsäure mit 2,2 : 1,2 : 0,9. Aminosäureanalysen der Autoren HIRAI et al. (53), NISHI (116) und RUOSLAHTI (147, 148) stimmen im wesentlichen überein.

Zu dem Problem von Varianten fanden ALPERT et al. (12,13) zwei Hauptformen des AFP (des fetalen wie des PLC-assoziierten), der Unterschied lag in den isoelektrischen Punkten (4,82 und 5,2) und konnte durch Neuramidase-Behandlung zu einem homologen Verhalten umgewandelt werden. SMITH et al. (167) konnten in fetalen Seren von Ratten und in humanem Hepatomserum zwei mikromolekulare AFP-Varianten nachweisen, die sich in ihrem elektrophoretischen, aber nicht in ihrem immunologischen Verhalten unterschieden.

Hinsichtlich der Halbwertszeitbestimmung gibt es unterschiedliche Angaben, die zwischen 2 und 9 Tagen liegen. Weiteres dazu siehe Seite 108, wo wir die eigenen HWZ-Berechnungen diskutieren.

2.4 Nachweismethoden

Während auf die Forschungsergebnisse der Reinigung von AFP in der Diskussion unserer eigenen Resultate ausführlich eingegangen wird und dort auch die verschiedenen radioimmunologischen Bestimmungsmethoden verglichen werden, seien an dieser Stelle die übrigen quantitativen Nachweismethoden kurz erwähnt. Nicht quantitativ, aber bis zu einer Konzentration von ca. 1-5 µg/ml (89) positiv bietet sich noch immer als Suchtest die zweidimensionale Doppeldiffusion nach Ouchterlony an, deren Empfindlichkeit durch Einengung des Patientenserums (3-5-fach) gesteigert werden kann. Die meisten klinischen Veröffentlichungen basierten bisher auf diesem Verfahren, indem sie die Kriterien "Ouchterlony positiv bzw. negativ" anlegten.

Eine Übersicht der weiteren, immer sensibler entwickelten Methoden gibt die folgende Aufstellung (angelehnt an die Übersicht von LAMERZ und FATEH-MOGHADAM (82).

Methode	Empfindlichkeit	Ref.
Ouchterlony-Doppeldiffusionstechnik	1-5 µg/ml	89
Fluoroelektroimmundiffusion	0,5 µg/ml	120
Elektroimmunodiffusion	1 mg/ml - 350 ng/ml	11,123, 165
Überwanderungselektrophorese	3,6-10 µg/ml	11,27,74, 75,89,170
Laurell-Immunelektrophorese	2 µg/ml	50,122
Latex-Agglutination	1,6 µg/ml	14,89
einfache radiale Immunodiffusion	1-50 µg/ml	50,162
indirekte Immunoautographie bzw. Autoradiographie	15-30 ng/ml	5,35,162
passive Hämagglutination	30 ng/ml	88,89,91
Aggregat Hämagglutination	30 ng/ml	5,87,127
Enzym Immunoassay	50 ng/ml 1 ng/ml	15 20
Radioimmunoassay	- 0,25 ng/ml	

2.5 K l i n i s c h e A n w e n d u n g s g e b i e t e

Neben der in dieser Arbeit untersuchten Beziehung zwischen AFP und Lebererkrankungen hat die AFP-Serumbestimmung noch in der Urologie und Gynäkologie Bedeutung erlangt. In der Urologie dient sie der Differentialdiagnose bei Hodentumoren zwischen Seminomen (negativ) und Teratokarzinomen (positiv mit Konzentrationen bis in den mg%-Bereich), und nach erfolgter Operation der Kontrolle während der Strahlentherapie oder/mit Zytostatikabehandlung.

Als Kontrollparameter im mütterlichen Serum während der Schwangerschaft konnte sich das AFP bisher zwar nicht durchsetzen, wohl aber scheint die Konzentrationsbestimmung im Fruchtwasser frühzeitige (etwa ab 15. Schwangerschaftswoche) Hinweise auf Mißbildungen zu geben (ausführliche Behandlung dieses Fragenkomplexes Dissertation E.Hiermeyer).

3. METHODIK

3.1 E i w e i ß b e s t i m m u n g

Nach der Biuretmethode von WEICHSELBAUM (188) wurde das Gesamteiweiß bestimmt, wobei 0,02 ml Serum in 1 ml Biuretreagenz¹ bei 546 nm im Spektralphotometer² gemessen wurden.

3.2 C A F - E l e k t r o p h o r e s e

Zur elektrophoretischen Untersuchung wurden die Fraktionen im Standardverfahren auf Cellulose-Acetat-Folien (255 x 145 mm) bei einer Spannung von 250 V und einer Stromstärke von 10 mA/cm in einer Laufzeit von 60 min. aufgetrennt. Die mit Amidoschwarz 10B gefärbten Folien wurden mit einem Extinktions-Integralschreiber E 3³ ausgewertet.

3.3 D o p p e l - G e l - D i f f u s i o n nach Ouchterlony

Die zweidimensionale Doppeldiffusion erfolgte nach der Technik von OUCHTERLONY (128,129). In 2%igem Difco-Agar auf Objektträger-

gern wurden mit Mikrostanzen 6-8 Zirkulär-Reservoirs (2mm ϕ) und zentral 1 Reservoir (2 bzw. 4 mm ϕ) gestanzt. Nach Diffusionszeiten zwischen 24 und 48 h wurden die Präparate in in physiologischer Kochsalzlösung gewässert, getrocknet und dann in einer Azokarminlösung (0,4%iges Azokarmin in Eisessig/Methanol 1:10) gefärbt, anschließend in Methanol - Eisessig (10:1) entfärbt.

3.4 Einfache radiale Immundiffusion

Diese Methode wurde nach dem von MANCINI (96) angegebenen Verfahren auf kommerziellen Platten ⁴ durchgeführt. Die Diffusionszeit betrug bei jeweils 5 μ l Ansatzlösung für Makroglobuline (IgM, α_2 M) bei 48 h, sonst bei 24-36 h. Die Auswertung erfolgte nach MANCINI unter Berücksichtigung der terminalen Präzipitationsfläche. Die Präzipitationsringe wurden mit einem Spezialmikroskop mit Dunkelfeld ⁵ vermessen. Nach einem von LAMERZ und FATEH-MOGHADAM ausführlich beschriebenen Rechenprogramm (81) wurden die Meßergebnisse auf dem OLIVETTI-Tischrechner P 101 bzw. DORROUGH'S 200 ausgewertet.

3.5 Semiquantitativer Antikörper-Titer Vergleich

Um Aufschluß über die immunologische Potenz der verschiedenen Antikörper zu gewinnen wurden nach dem Prinzip der einfachen radialen Immundiffusion eigene Immundiffusionsplatten ⁶ hergestellt.

Dazu brachten wir Difco-Agar zum Sieden, ließen ihn auf 56°C abkühlen und mischten dann Alpha Fetoprotein ⁷ hinzu, wobei

1 Merkotest, Fa.E.Merck, Darmstadt

2 Fa-Hitachi-Perkin-Elmer 139 Spektralphotom. bzw. DB Spektral-Photometer Beckman

3 Fa. Zeiss KG, Wetzlar

4 Fa. Behringwerke, Marburg

5 Fa. E. Zeiss KG, Wetzlar

6 Wir benutzten dabei eine leere und gereinigte Form der Fa. Hyland

7 AFP-Antiserum der Fa. Behringwerke

8 Fa. Camag, Muttens, Schweiz

sich eine 2,5%ige Konzentration am günstigsten erwies. Mit diesem Gelgemisch wurde eine Form¹ ausgegossen und Reservoirs hineingestanz. Als Vergleichssubstanz füllten wir AFP-AK² in den Verdünnungen 1:1, 1:3, 1:6 in Mengen von 5 µl in die ersten Löcher, während wir die nächsten mit eigenen Antiseren, teils von verschiedenen Tieren, teils Fraktionen der DEAE-Cellulose-Chromatographie in sich nach wiederholten Versuchen ergebenden Verdünnungen beschickten.

Der Präzipitationsvorgang war nach 48 h beendet und durch Ausmessen der Präzipitationsringe konnten die eigenen Antiseren miteinander mit denen im Handel erhältlichen verglichen werden.

3.6 Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese führten wir nach dem Verfahren von GRABAR und WILLIAMS (46) in der Mikromodifikation von SCHEIDEGGER (157) auf Objektträgern in der Kammer der Fa. CAMAG³ bei einer Spannung von 200V, Stromstärke von 25 mA und einer Laufzeit von 60 Min. durch. Als Gel wurde 2%iger Reinagar in einem 1:2 verdünnten Veronal-Na-Acetat-Puffer nach MICHAELIS verwendet; gefärbt wurde mit Azokarmin in Eisessig-Methanol-Lösung 1:10, 0,4%ig.

-
- 1) Wir benutzten dabei eine leere und gereinigte Form von gebrauchten Immundiffusionsplatten der Fa. Hyland.
 - 2) AFP-Antiserum der Fa. Behringwerke
 - 3) Fa. Camag, Muttensz, Schweiz

3.7 Präparative Elektrophorese mit Kartonpapier als Trägermaterial

Dieses Verfahren wurde nach der Methode von KNEDEL und SPERL (71) durchgeführt. Für die Trennung wurden zwei Trennkammern im Ausmaß von 66 x 45 cm¹ benutzt, in denen Platz für die Aufnahme von je 3 Trägerbrücken zu je 22 x 21 cm ist. Auf jede Brücke konnten 2 Kartonstreifen in der Größe 30 x 8 cm befestigt werden, welche mit je 1 ml Serum beschickt wurden. Das Kartonpapier wurde in der Größe 30 x 8 cm des Typs MN 866 (100 4 Baumwolle, Maschinenpapier) direkt vom Hersteller² bezogen. Als Puffer wurde ein 1:1 verdünnter Veronal-Na-Acetatpuffer nach MICHAELIS verwendet, pH 8,6 und 0,02% Zusatz von Na-Azid. Bei einer Spannung von 200 V ($\approx$ 6-12 V/ cm Kartonstreifen) und einer Stromstärke von etwa 80 mA betrug die Trennzeit 15-16 Stunden. Nach Beendigung eines Laufes wurden die auf einer Trennlänge von 12 cm aufgetrennten Fraktionen mittels dem Abklatschverfahren von COUSDEN und Mitarb. und einer Färbung mit Amidoschwarz 10 B lokalisiert. Die so identifizierbaren Fraktionen wurden ausgeschnitten und die gewünschten Papierstreifen mit einer speziellen hydraulischen Presse³ von 20 to ausgepresst. Die gewonnenen Fraktionsvolumina wurden vor der Weiterverarbeitung zentrifugiert und filtriert.

1) Hersteller: Fa. Bender und Hobein, München

2) Fa. Machery- Nagel & Co, Düren-Rolsdorf

3) Fa. P. Weber, Stuttgart-Uhlbach

3.8 Säulenchromatographie

3.8.1 Gelfiltration

Um die Proteine in den Fraktionen nach ihrer Molekülgröße zu trennen, wurde die Methode der Molekularsieb-Chromatographie benutzt. Als Gel kam Sephadex¹ zur Anwendung, ein kugelförmiges, polymerisiertes Dextran. Da die Trennbereiche für verschiedene Molekulargewichte abhängig von der Partikelgröße und dem Quervernetzungsgrad des Gels sind, wurden die verschiedenen Sorten für folgende Präparationen verwendet :

Sephadex G- 200, das von MG 5 000 - 800 000 trennt, sowie Sephadex G-100 (4 000 - 150 000) zur Trennung von Nabelschnurserum- Kartonfraktion 2 in den Säulengrößen 2,5 x 80 cm mit dem Elutionspuffer Tris HCL 0,05 mol in 0,1 n NaCl pH 6,0 und Zusatz von 0,02%igem Na-Azid; außerdem Sephadex G-200 in einer Säule 1,5 x 35 cm zur Endreinigung von ¹²⁵J-markiertem AFP und Elution durch 0,07 mol Veronal-Puffer pH 8,6. Sephadex G-50 Fine, das von MG 1500 - 30 000 trennt, zur Erstreinigung von ¹²⁵J-markiertem AFP, in einer Säule 1 x 15 cm mit 0,07 mol Veronalpuffer pH 8,6.

Sephadex G- 25 Medium, das von MG 1000- 5000 trennt, zur Entsalzung von reinsten AFP-Fractionen vor der Lyophilisation in einer Säule 1 x 15 cm mit aqua-dest.

Das Gießen der Säulen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Elution geschah unter kontinuierlicher Absorbtionsmessung bei 280 nm² und Sammlung von 6 ml- Fraktionen mittels eines Fraktionskollektors³.

1) Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden

2) Uvicord I bzw. II, Fa LKB, Bromma, Schweden

3) Ultra Rac Fraktionskollektor, Fa. LKB, Bromma, Schweden

3.8.2 Cyano-Bromid aktivierte Sepharose

3.8.2.1 Prinzip der Methode

Unter Affinitätschromatographie versteht man eine Adsorptionschromatographie, bei der das Säulenbettmaterial eine biologische Affinität zu dem Stoff besitzt, der isoliert werden soll. In unserem Fall bildete ein Sepharose-Gel, das mit einem homologen Antikörper gekoppelt wurde, das absorbierende Medium. Für das hochmolekulare Immunglobulin eignet sich besonders die großporige Struktur der Sepharose 4 B, das mit dem Liganden durch kovalente Bindungen einen unlöslichen Komplex zu bilden vermag. Um den Liganden mit der Matrix zu koppeln, hat sich die Cyano-Bromid-Methode (18) empirisch bewährt, deren Wirkungsmechanismus aber noch unbekannt ist. Man diskutiert, daß CNBr mit den Hydroxygruppen der Sepharose reagiert - unter Bildung von zyklischen und azyklischen Imidokarbonatgruppen, welche bei der Proteinkopplung mit deren primären Aminogruppen kovalente Bindungen bilden (18,61).

Läuft nun über eine solche mit spezifischem Antikörper gekoppelte Sepharose-Säule ein Protein-Gemisch, so wird nur das entsprechende Antigen gebunden und zurückgehalten, während die übrigen Substanzen dem Wascheluat folgen. Durch Pufferwechsel in einen stark sauren Bereich wird der Ionisationsgrad der Ladungsgruppen an den Bindungsstellen der Proteine (AK-AG) verändert, was einer Lösung der Bindung gleichkommt, da diese sich hauptsächlich bei physiologischem pH konsolidieren.

3.8.2.2 Durchführung der Methode

10 g stabilisierte CNBr-aktivierte Sepharose 4 B¹ wurden in 2000 µl 0,001 mol HCl 15 Min. gewaschen, um beigefügtes Dextran und Lactose zu entfernen.

100 mg Anti-AFP-IgG vom Kaninchen wurden in 100 ml 0,1 mol NaHCO₃ mit 0,5 mol NaCl pH 8,3 gelöst, das gewaschene Gel bis auf 100 ml in einer Fritte abgesaugt und mit dem Antikörper vermisch. Nach Auffüllen mit dem NaHCO₃-Puffer auf ein Volumen von 400 ml wurde die Mischung in 4 Plastikflaschen a 100 ml

1 Fa. Pharmacia, Uppsala

gefüllt, sodann erfolgte bei Raumtemperatur 2 h langsame Vertikalrotation. Ungebundener Antikörper wurde dann mit dem NaHCO_3 -Puffer in der Fritte ausgewaschen, die restlichen reaktiven Gruppen des Gels mit 1 M Äthylalanin pH 8,0 bei Raumtemperatur 2 h blockiert. Zur Entfernung von nicht kovalent gebundenem AK waren 3 Waschzyklen mit 0,1 mol Acetat-Puffer in 1 mol NaCl pH 8,0 und Boratpuffer notwendig, danach konnte die Säule gegossen werden und war gebrauchsfertig, wobei wir eine 15 x 1,7 cm große Säule¹ verwendeten. Nach Vorlaufen mit dem Startpuffer (0,2 mol Tris-HCl-Puffer in 0,5 mol NaCl pH 8,0) wurde die gegen Startpuffer dialysierte Fraktion aufgetragen und mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/Min. eluiert. Extinktionsmessung bei 278 nm, die Registrierung erfolgte mit den oben erwähnten Geräten. Nach Erscheinen des ersten großen Peaks wechselten wir auf den Endpuffer (0,2 mol Glycin-HCl-Lösung mit 0,5 mol. NaCl pH 2,8) um. Mit dem pH-Umschlag erschien ein kleiner Peak, wonach auf den Startpuffer zurückgeschaltet wurde. Um das Protein nicht zu lange im sauren Eluat-Milieu zu belassen, waren den Fraktionsgefäßen 3 ml Startpuffer vorgegeben, sodaß der pH-Wert im neutralen Bereich lag. Anschließend engten wir die Fraktionen in den Kollodiumhülsen gegen Startpuffer ein und entsalzten die AFP-Fraktion auf einer Sephadex G-25-Säule 20 x 1,5 mit Aquadest. Das Protein wurde dann lyophilisiert.

3.8.3 DEAE - Cellulose - Ionenaustauschchromatographie

Zur präparativen Auftrennung von Serumproteinen ist die Ionenaustauschchromatographie nach PETERSON und SOBER (133,134) auf Diäthylaminoäthyl (DEAE) - Cellulose-Säulen ein bewährtes Verfahren, das wir mit dem Ziel anwandten, aus dem Kaninchen-serum die Immunglobuline möglichst rein zu gewinnen.

Bei der Vorbereitung der DEAE-Cellulose und dem Gießen der Säule richteten wir uns nach der Beschreibung von KNEDEL und FATEH-MOGHADAM (73). Benutzt wurde DEAE-Cellulose² mit einer Kapazität von 0,6-1,0 meq/g bei pH 6-9, die Säule hatte die Größe 175 x 2,5³. Der erforderliche kontinuierliche Puffer-

1 Fa Pharmacia, Uppsala

2 von der Fa Serva, Heidelberg

3 der Fa. Pharmacia, Uppsala

gradient wurde nach der Anordnung von KNEDEL u.a. (72) mit Rundkolben als Ergänzungs- und Erlenmeyerkolben als Mischgefäß erzielt, sodaß ein konvexer Gradient resultierte. Als Startpuffer diente 0,01 mol. Na-Phosphatpuffer pH 8,0, als Grenzpuffer 0,03 mol. Na-Phosphatpuffer pH 4,5. Die Elutionsgeschwindigkeit wurde mit einer Schlauchpumpe konstant gehalten. Nach Auftragen des vordialysierten Serums (Volumen nicht mehr als 1/10 des Säulenvolumens wurde bis zum Erscheinen des ersten Peaks mit Startpuffer eluiert, dann der Puffergradient mit dem Endpuffer eingestellt. Die eingengten Fraktionen wurden in 0,5 ml Portionen bei -70°C gelagert.

3.9. K o n z e n t r i e r u n g

Die Einengung von eiweißhaltigen Flüssigkeiten in kleine Volumina, wie sie bei Fraktionen säulenchromatographischer Untersuchungen auftreten, wurde durch Druckfiltration mit Kollodiumhülsen (SM 132 00) aus Cellulosenitrat (15 x 75 mm) in speziellen Haltevorrichtungen (SM 16311)¹ durchgeführt. Die Hülsen tauchten in eine Dialysierflüssigkeit ein, an welche durch eine Wasserstrahlpumpe ein Vakuum bis 500 mm Hg angelegt werden konnte. Die Einengungsdauer betrug je nach Menge der Flüssigkeit und Eiweißkonzentration zwischen 1 und 15 Stunden. Bei einigen Untersuchungen von Patienten-seren mittels der OUCHTERLONY-Technik auf AFP wurde zur Verbesserung der Empfindlichkeit eine Serumkonzentration auf 1/4 bis 1/5 durch Verwendung der Einengungsvorrichtung MINICON A 25² (Ausschlußgrenze bei ca MG 30 000) vorgenommen.

3.10 Z e n t r i f u g a t i o n

Serumproben für die AFP-Bestimmung wurden durch Zentrifugation von Nativblut bei 1000 g (3000 UpM) in einer HERAEUS-CHRIST-Zentrifuge Typ UJ S S³ für 10 - 20 Minuten gewonnen.

¹ Fa. Sartorius-Membranfiltergesellschaft, Göttingen

² Fa. Amicon, Oosterhout, Holland

³ Fa Christ, Osterode/Harz

Nabelschnurserum sowie andere Fraktionen wurden vor Auftragung auf eine Säule zur Chromatographie stets für 10 Minuten bei 3000 UPM in der gleichen Zentrifuge zentrifugiert.

3.11 Lyophilisierung

Bei den AFP-Reinpräparaten wurde die Abschlußkonzentrierung mit entsalztem Material durch Lyophilisation vorgenommen. In je 10 ml-Portionen wurden sie in kleinen 5 ml-Gläschen eingefroren und unter der Vakuumblocke des Lyophilisiergerätes Typ 230 der Fa. CHRIST¹ lyophilisiert. Die Lyophilisierungszeit betrug zwischen 10 und 15 Stunden.

3.12 Herstellung des Antiserums

3.12.1 Immunisierung

Zur Gewinnung von Antiserum gegen Alpha-Fetoprotein wurden 4 Kaninchen (weiblich, Alter ca. 6 Monate, Rasse: weiße Neuseeländer) immunisiert.

Die Immunisierung erfolgte nach einem Schema von HIJMANS et al.(51), das folgendermaßen modifiziert wurde:

Zur Erstimmunisierung wurden 180 µg Reinantigen in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und mit gleichem Volumen komplettem Freund'schem Adjuvans² gemischt. Die Suspension wurde in 2-4 Fußsohlen (0,2-0,3 ml/ Fußsohle) und der Rest i.m. appliziert. 1 Woche wurde die gleiche Antigendosis in inkomplettem Freund'schem Adjuvans an gleicher Stelle injiziert. Nach 3 Wochen folgte eine Serie von wöchentlichen i.v.-Immunisierungen in die Ohrvenen über 3 Wochen mit steigenden Mengen einer KAL-präzipitierten Antigenlösung folgender Herstellung :

Zu 1 mg AFP in 2,5 ml gepuffertem NaCl wurden 1,15 ml in Bikarbonatlösung und dann 2,5 ml einer 10%igen KAL-Sulfatlösung tropfenweise hinzugefügt. Nach 24 h Inkubationszeit

¹ Fa. Christ, Osterode, Harz

² Fa. Difco-Laboratories, Detroit, Mich.

bei 4°C wurde mit 3000 Rpm Min. zentrifugiert und dann das Präzipitat in 4 ml gepuffertem NaCl resuspendiert. Mit dieser Antigensuspension wurde 3 Wochen nach der letzten s.c. bzw. i.m.-Boosterung nach diesem Schema immunisiert :

- | | | | | |
|----------|---------|-----|--------|------|
| 1. Woche | 0,05 ml | und | 0,1 ml | i.v. |
| 2. Woche | 0,10 ml | und | 0,2 ml | i.v. |
| 3. Woche | 0,20 ml | und | 0,4 ml | i.v. |

Eine Woche nach der letzten Applikation wurden dem Hasen Blutproben entnommen, und diese 1 Stunde bei 37°C und über Nacht bei 4°C inkubiert, dann zentrifugiert. Das dekantierte Immunserum wurde nach der OUCHTERLONY-Technik auf spezifische und unspezifische Antikörper untersucht. Ergab sich eine ausreichende Konzentration des Antikörpers gegen AFP, wurde das Kaninchen nach Ablauf einer weiteren Woche entblutet.

Bei zu geringer spezifischer Antikörperbildung wurde entweder noch für einige Wochen mit 1-wöchentlichen Injektionen von 0,5 ml Antigensuspension i.v. immunisiert oder die Immunisierung abgebrochen.

3.12.2 Reinigung des Immunserums

Auch wenn keine Antikörper gegen Verunreinigungen im Kaninchenserum nachgewiesen werden konnten, wurde dennoch mit lyophilisierten gepoolten Normalserum-Proteinen in einer Menge von 2-4 mg/ml Antiserum absorbiert, da die Immunisierungssubstanz AFP aus menschlichem Serum gewonnen worden war. Das Gemisch inkubierte 1 Stunde bei 37 °C und wurde dann mit 10 000 Rpm zentrifugiert, der Überstand gegen 0,01 mol. Phosphatpuffer pH 8,0 äquilibriert.

Anschließend wurde das Antiserum der DEAE-Cellulose-Chromatographie unterworfen, um reine IgG-Fractionen zu gewinnen, da dieser Immunglobulinanteil nach Testung stets die überwiegende Menge spezifischer Antikörper gegen AFP enthielt. Nach der oben beschriebenen Elution wurden die ersten 2-3 gepoolten und konzentrierten Sammelfractionen nach

Testung auf Reinheit und Aktivität des Antikörpers vereinigt, in kleine Portionen von 0,5 ml aufgeteilt und bis zur Benutzung bei -70°C aufbewahrt.

3.13 Radio Immuno Assay

3.13.1 Markierung des Antigens

Bei der Kopplung des AFP mit radioaktiver Substanz gingen wir nach der Chloramin T-Methode von HUNTER (56) vor. Das p-Toluolsulfonchloramid (Chloramin T) begünstigt aus noch nicht vollständig aufgeklärten Ursachen den Einbau von radioaktivem NaJ in Proteine. Diese Reaktion lässt sich mit Na-Disulfit abstoppen, was eine genaue Abgrenzung der Markierungszeit erlaubt. Vor dem Markierungsvorgang müssen zwei Sephadex-Säulen wie folgt vorbereitet werden:

- 1.) 5g Sephadex G 50 Fine¹ in 0,07 mol. Veronal-Puffer pH 8,6 quellen lassen, nach dem Gießen auf eine 15 x 1cm große Säule nachwaschen mit 10 ml des gleichen Puffers, 1 ml Veronalpuffer + 2,5% BSA vorlaufen lassen.
- 2.) 5g Sephadex G 100¹ in 0,07 mol. Veronal-Puffer quellen lassen, gießen auf eine Säule (35 x 1,5), nachwaschen mit 50 ml Veronalpuffer 0,1 mol. + 0,1% BSA + 0,9% NaCl.

Markiert wurde nach folgendem Schema, wobei wir die Kunststoffreagenzgefäße der Fa. Eppendorf verwendeten:

20 μl	$\text{J}^{125} \hat{=} 0,2 \text{ mCi}^2$
10 μl	Phosphatpuffer 0,5 mol pH 7,5
20 μl	AFP $\hat{=} 5\mu\text{g}$ Antigen in 0,05 mol Phosphatpuffer, pH 7,5
20 μl	Chloramin ($\hat{=} 50 \mu\text{g}$ in 0,05 mol Phosphatpuffer
vorsichtig mischen nach 25 Sekunden	
30 μl	Na-Disulfit ($\hat{=} 12 \mu\text{g}$ in 0,05 mol Phosphatpuffer
200 μl	0,05 mol Phosphatpuffer + 2% BSA
Mischen	

¹ Fa. Pharmacia, Uppsala

² Jod^{125} , Natriumjodid zur Eiweißmarkierung ohne Reduktionsmittel; Farbwerke Hoechst, Frankfurt/Main

Um das markierte Protein von Bruchstücken, Salzen und überschüssigem Na-Jodid zu trennen, wurde das Gemisch an Sephadex G 50 Fine chromatographiert. Eluiert wurde das radioaktive Substrat mit 0,07 mol Veronalpuffer. In die das Eluat auffangenden Röhrchen gaben wir 0,2 ml von 0,07 mol Veronalpuffer + 2,5% BSA jeweils vor. Das Gesamtvolumen pro Fraktion betrug dann 1 ml. Die Radioaktivität wurde mittels eines Gammazählers¹ für jeweils 30 sec ermittelt. Die Fraktion des Proteinpeaks mit der höchsten Zählrate wurde auf der Sephadex G-100-Säule rechromatographiert, mit demselben Veronalpuffer, jedoch ohne Vorgabe einer Albumin-haltigen Lösung. Nach erneuter Zählung der Fraktionen verdünnten wir die in Frage kommenden radioaktiven Substanzen mit RIA-Verdünnungspuffer 1:100 und lagerten sie in 10 ml-Porteionen bei -70°C.

3.13.2 Austestung des ersten Antikörpers

In einem Testansatz werden einer gleichen Quantität von markiertem Antigen der monospezifische Antikörper in steigender Verdünnung zugefügt und inkubiert. Nach Zugabe eines zweiten Antikörpers im Überschuß, der gegen das erste IgG und damit auch gegen den AG/AK-Komplex gerichtet ist, gewinnt man das in einer Lösung befindliche Präzipitat nach Zentrifugieren durch Abkippen des Überstandes. Die Aktivität im Präzipitat gibt Aufschluß über die erfolgte Bindung zwischen markiertem Antigen und erstem Antikörper und über den letzten Verdünnungsgrad, bei welchem eben noch eine Immunreaktion zwischen beiden feststellbar ist.

Im "N-Wert" untersucht man die dem Testsystem immanente Aktivität, indem man nur Antigen und zweiten AK unter den gleichen anderen Versuchsbedingungen reagieren läßt und nach dem Zentrifugieren die verbleibende Aktivität mißt, deren Nieder schlag aus Gefäßwand-Affinität und anderen Parametern erklärt werden muß.

Den Puffer für den RIA stellten wir wie unten angegeben selbst her, wobei wir Rinderalbumin und EDTA beifügten. Letzteres wird von MORGAN et al (113) zur Neutralisation von Inhibitoren (Complement?) der Reaktion des AG/AK-Komplexes mit dem 2. Antikörper empfohlen.

Durchführung

Der Ansatz zur Antikörperverdünnungskurve erfolgte in 2 ml fassenden Kunststoffgefäßen nach diesem Schema :

Totals: 100 µl markiertes Antigen
 400 µl Verdünnungspuffer

N-Wert: wie "Probe", jedoch ohne 1. Antikörper

Probe: 200 µl Verdünnungspuffer + 10%iges Pferdeserum
 100 µl markiertes Antigen + stabilisiertes Kaninchenserum der Fa. Behringwerke 1:360
 100 µl 1. Antikörper sorgfältig mischen in den gewünschten Verdünnungen, 24-48 h bei Raumtemperatur inkubieren
 100 µl 2. Antikörper ¹ 1:20 verdünnt
 Bei Raumtemperatur 24 h inkubieren
 30 Minuten zentrifugieren bei 3000 U/Min.

Den Überstand dekantierten wir und wischten danach die Röhrchen sorgfältig mit Filterpapier aus, ohne jedoch das Präzipitat am Gefäßboden zu berühren, sodaß die Wände frei von Flüssigkeitstropfen waren. Die Aktivität wurde in einem Gammazähler ² je 60 sec gemessen.

3.13.3 Standard-Verdrängungskurve - Ansatz

Prinzip

Wenn um die Bindungsstellen am monospezifischen Antikörper neben dem radioaktiven Antigen noch freie Antigene konkurrieren, verdrängen diese mit zunehmender Konzentration das markierte Protein, was sich in abnehmenden Zählraten des Präzipitats niederschlägt. Ist die Menge des freien Antigens definiert, so kann man mit einer Verdünnungsreihe bei gleichbleibender Konzentration von markiertem Protein, erstem und zweitem Antikörper eine Standardkurve aufstellen, bei der die Menge des Standards in umgekehrtem Verhältnis zu den gemessenen Counts steht.

1 Anti-Kaninchen IgG Fa. Behringwerke und v. Esel, Fa. Welkome
2 80 000 Gamma Sample counter Wallac Fa. LKB

Durchführung

Test-Anordnung :

Totals und N-Wert wie bei der AK-Verdünnungsreihe(3.7.)
Vom Standard¹ wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, die
von 2,5 - 320 ng/ml AFP reichte.

Ansatz:

200 µl RIA-Verdünnungspuffer (wie oben) + 10%iges Pferdeserum
100 µl Standardlösung(bzw. Verdünnungspuffer für den o-Wert)
100 µl 1.Antikörper 1:120 000, sorgfältig auf Vortex-Mischer
mischen

100 µl AFP¹²⁵

gut mischen, 24-48h bei Raumtemperatur inkubieren

100 µl 2. Antikörper (wie oben)

24 h bei Raumtemperatur stehen lassen

30 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugieren, abkippen, durch Aus-
wischen trocknen.

Im Gammazähler jeweils 60 sec die Aktivität messen.

Bei Seren-Untersuchungen wurden 100 µl Analysenlösung (even-
tuell in geeigneter Verdünnung) mit dem gleichen RIA-Puffer
an Stelle des Standards einpipettiert und ansonsten analog
verfahren.

3.13.4 Kommerzieller Radioimmunoassay für AFP

Radioimmunologische Bestimmungen von Alpha-Fetoprotein wur-
den auch mit einem handelsüblichen Test der Fa. Abbot GmbH,
Eschborn, durchgeführt, welcher auf dem Prinzip der Doppel-
antikörpermethode basiert und eine untere Empfindlichkeit
von 5 ng/ml besitzt. Es wurde nach der Testanweisung des Her-
stellers verfahren, im wesentlichen entspricht der Ansatz dem
oben beschriebenen, eigenen Verfahren.

1 Wir gleichen eigene AFP-Lösungen dem Standard des RIA der
Fa. ABBott GmbH, Eschborn, an.

3.14 Rechnerische Auswerteverfahren

3.14.1 Markierung

Unter der Voraussetzung, daß beim Koppeln mit Radioaktivität das Protein gleichmäßig und vollständig markiert wurde, berechneten wir anhand der counts pro Zeiteinheit den Verlust, die Proteinmenge und die spezifische Aktivität¹.

Verlust: Die Verlustprozente der Restcounts (=verbleibende Aktivität in geleerten Markierungsgefäßen, benutzte Pipettenspitzen) von der Totalaktivität wurden ebenfalls auf die Proteinmenge bezogen:

$$\frac{\text{Rest-counts}}{\text{Total counts}} = \frac{\text{Aktivitätsverlust}}{\text{Totalaktivität}} = \frac{\text{Proteinverlust}}{\text{Ausgangsproteinmenge}}$$

1. Säulentrennung:

Die Summe der counts in allen Elutionsgefäßen wurde als 100% gesetzt, und davon die Prozentanteile des Protein-Peaks und des Salz-Peaks bestimmt, woraus die Aktivität in mCi, die auf jeden Peak entfiel, errechnet werden konnte. Von der Summe der counts des Proteinpeaks (100%) ergab der Prozentanteil der Fraktion mit der höchsten Zählrate gleichfalls den Proteinanteil in Prozent der gesamten eluierten Antigenmenge. Proteinmenge in µg und Aktivität in µCi konnten so für jene Fraktionen berechnet werden, die auf Sephadex G-100 rechromatographiert wurde :

$$\frac{\text{Peak counts}}{\text{Fraktions-counts}} = \frac{\text{Peak Aktivität}}{\text{Frakt.-Aktivität}} = \frac{\text{Peak-Proteingehalt}}{\text{Frakt.Proteingehalt}}$$

Bei der 2. Säulentrennung erfolgte die Berechnung in analoger Weise. Ausgangsmenge waren die Antigenmenge und Aktivität, die für die eine Fraktion der vorherigen Chromatographie ermittelt worden waren, wobei wir einen etwaigen Verlust durch Verbleib von Aktivität in der Säule unberücksichtigt lassen mußten. Eine gewisse Kontrolle war dadurch gegeben, daß man

1 Mit eigenen Rechenprogrammen für den Tischkomputer Olivetti P 101 und Burroughs C 7200

die Summe der Zählraten beim 2. Durchlauf mit der der aufgetragenen Fraktion verglichen. Aus dem Prozentanteil der zwei für die weitere Verwendung in Frage kommenden Fraktionen von der Summe aller counts im Eluat errechneten wir die Protein- und Aktivitätsmenge. Die beiden Werte ergaben dann die spezifische Aktivität des markierten Proteins in $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

3.14.2 Radio Immuno Assay

Die Auswertung erfolgte zeichnerisch und rechnerisch unter Berücksichtigung der Zählraten von Totalaktivität, N-Wert, o-Wert (=Maximalbindung des allein vorhandenen markierten Proteins), Standard- und Analysenlösung.

Die Zählrate des N-Wertes zogen wir als Background von allen anderen Zählraten ab, da er die Aktivität repräsentiert, die dem Testsystem durch Aktivitätsverbleiben am Glas, durch eventuelle Bindung zwischen Antigen und 2. Antikörper o.a. immanent ist. Die counts der Standard- oder Probenlösungen wurden in Prozent des Nullwertes berechnet und diese Prozentwerte in einem rechtwinkligen Koordinatensystem mit linearer Ordinate der Prozentaktivität gegen die Logarithmen der AFP-Konzentration (ng/ml) aufgetragen (Lin - Log - Papier). Die Verbindung der Punkte ergibt typischerweise eine abgeflachte s-förmige Kurve, an welcher die Konzentrationswerte der Analysenlösungen abgelesen werden können.

Die rechnerische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines eigenen Computerprogramms für die Tischcomputer Olivetti P 101 und Burroughs C 7200, das bei LAMERZ u.a. (80) für einen anderen RIA ausführlich beschrieben wird.

Dabei werden die Prozentaktivitätswerte des Standards nach der Formel

$$l = \ln \frac{P}{100-P} \quad \begin{array}{l} p = \% \text{ Aktivität} \\ l = \text{Logit} \end{array}$$

in Logits umgewandelt, worauf eine lineare Beziehung zwischen den Prozent-Aktivitätswerten und den zugehörigen Logarithmen der AFP-Konzentration zu Stande kommt. Die Bezugsgerade wird

durch die Berechnung der linearen Regressionsgeraden aus den Wertepaaren der einzelnen Standards nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate erstellt.

3.14.3 Halbwertszeit

Zur Berechnung der Halbwertszeit des Alpha-Fetoproteins bei dessen Anstieg und Abfall nach partieller Hepatektomie wurden die Regressionsgeraden bei 3-6 der ersten Koordinatenpaare post operationem (x =AFP - Anstieg, y =postoperativer Tag) bestimmt. Auf dieser Geraden wurde dann der Zeitpunkt ermittelt, bei dem die Höchstkonzentration post operationem auf die Hälfte gefallen war.

3. 15 S t a t i s t i s c h e B e r e c h n u n g e n

Folgende statistische Berechnungen wurden nach eigenen Programmen entsprechend der einschlägigen Literatur auf den oben genannten Rechnern durchgeführt :

Für die Meßwerte verschiedener Kollektive Arithmetisches Mittel ($\bar{x}$), Standardabweichung (s), Varianz (s^2), Variationskoeffizient (V.K.), Anzahl (N), Spannweite (R). Entsprechende Kennwerte für die Wurzel-, logarithmische, Kehrwert- und Wurzelkehrwert-Transformation.

Bei größeren und vor allem Patientenkollektiven wurden für die gemessenen Parameter Häufigkeitsverteilungen über zu Klassen zusammengefaßten ansteigende Konzentrationsbereiche bestimmt. Die Bereiche wurden entweder willkürlich nach sinnvollen Kriterien gerafft oder aber in Klassen mit äquidistanten Bereichen eingeteilt; bei AFP-Serumkonzentrationen von Patientenkollektiven erwies sich dabei eine vorherige logarithmische Transformation und nachfolgende Verteilung über äquidistante Bereiche als brauchbar. Bei normal verteilten Kollektiven erfolgten Mittelwertvergleiche nach dem t-Test, bei Abweichung nach dem U-Test bzw. nach Häufigkeitsverteilung nach dem parameterfreien KOLMOGOROFF-SMIRNOFF-Test.

Der Vergleich abhängiger Beobachtungen erfolgte bei angenäherter Normalverteilung der Paardifferenzen durch den t-Test für Paardifferenzen, sonst durch den WILCOXON-Test für Paardifferenzen. Bei Häufigkeitsverteilungen erfolgte Prüfung auf Normalverteilung durch den Chi-Quadrat- bzw. KOLMOGAROFF-SMIRNOFF- Anpassungstest.

4. MATERIALIEN

4.1 VERWENDETE SUBSTANZEN BEI DER HERSTELLUNG DES RIA

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung des AFP dienten uns einmal ca. 40 ml Serum eines an primärem Leberzellkarzinom erkrankten Patienten mit einer AFP-Konzentration von 11 mg%. Daneben und hauptsächlich stand uns Nabelschnurblut (aus der I. und II. Frauenklinik der Universität München) zur Verfügung, das mittels Punktion der plazentanahen Nabelvenen nach Abnabelung und durch Ausdrücken der Placenta gewonnen wurde und deren Seren wir poolten.

Den monospezifischen Antikörper gegen AFP für die Cyan Bromid aktivierte Sepharose 4 B-Säule bezogen wir bei der ersten Erprobung dieser Methode von der Fa. MEDAC, Für den eigenen RIA testeten wir als Standard aus : Verdünntes PLC-Serum- und Nabelvenenserum sowie eigenes reines Alpha-Fetoprotein. Als Referenzen dienten uns die Standardlösungen zu den RIA der Firmen ABBOT (320 ng/ml), IDW¹ (160 ng/ml), SERONO (40 ng/ml), die so auch miteinander verglichen werden konnten.

4.2 UNTERSUCHTES PATIENTENGUT

Eine Übersicht über die radioimmunologisch auf Alpha-Fetoprotein untersuchten Patientenserum gibt die folgende Tabelle (Tabelle 1).

1 Fa. IDW, Isotopendienst West

4.2.1 Kontrollgruppe

100 Seren dieses Kollektivs stammen von Routine-Blutabnahmen der Bundeswehr, d.h. von klinisch nicht auffälligen Rekruten im Alter von 18 - 24 Jahren kaukasischer Rassenzugehörigkeit.

Seren von	Fallzahl	Verläufe	Seren
Normalkontrollgruppe	140	-	140
Prim.Leberzell Karzinom	18		25
Sek.Lebermetastasen	15		15
Lebercirrhose	102	3	128
Hepatitis	70	33	231
mit chron.Verlauf	7	2	19
Akute Virushepatitis	63	31	213
Au AG positiv	35		
Au AG negativ	28		
Wegen Echinokokkus operierte	8	8	54
davon partiell hepa- tektomiert	6	6	42
insgesamt	353	44	593

Tab. 1: Untersuchtes Patientengut

40 Untersuchungen (männlich/weiblich 20/20 wurden bei Personen jüngeren und mittleren Lebensalters durchgeführt, bei denen aufgrund von anderen Serumuntersuchungen (BKS, Elektrophorese, Transaminasen) keine Krankheiten festgestellt werden konnten.

4.2.2 Patienten mit primärem Leberzellkarzinom

Serumproben von 18 Patienten mit primärem Leberzellkarzinom aus dem Zeitraum von 1970 -1975 gelangten zur Untersuchung. Davon konnten 14 Fälle histologisch und laparoskopisch gesichert werden, während bei den anderen 4 Fällen die Diagnose

aufgrund der Vorgeschichte (Lebercirrhose) und anderer klinischer Anhaltspunkte gestellt wurde. Die Geschlechtsverteilung lag bei 14/4 (Männer/Frauen) mit einer Altersverteilung von 2 Fällen unter 20 und 13 Fällen über 60 Jahren. Insgesamt bestand bei 2/3 der Patienten eine sichere Lebercirrhose, während in 3 Fällen auch histologisch kein Anhalt für eine Lebercirrhose entdeckt werden konnte.

4.2.3 Patienten mit Malignomen und sekundärer Leberbeteiligung

Als Vergleichsgruppe wurde ein Kollektiv von 15 Personen (8 Männer, 7 Frauen) mit histologisch und laparoskopisch oder szintigraphisch gesicherten Lebermetastasen folgender Primärtumoren untersucht: Magen-Adenocarcinom (n=3), Pankreascarcinom (n=2), Plattenepithelcarcinom der Lunge (n=1), Ovarialcarcinom (n=1), Gallenblasencarcinom (n=2), Koloncarcinom (n=2), Melanoblastom (n=1), Penisarcinom (n=1), unbekannter Primärtumor (n=2).

4.2.4 Patienten mit Leberzirrhose

Serumproben von 102 Patienten mit Leberzirrhose (62 Männer, 40 Frauen) im Alter zwischen 50 und 83 Jahren (70% zwischen 40 und 70 Jahren) wurden untersucht. Davon waren 69 Fälle histologisch gesichert. Bei den restlichen Fällen war die Leberzirrhose aufgrund klinisch-chemischer Parameter bzw. nach Vorgeschichte, Tastbefund und klinischem Bild höchstwahrscheinlich.

4.2.5 Patienten mit Hepatitis

Serumproben von 63 Patienten mit akuter und 7 mit chronischer Hepatitis (35 Männer, 28 Frauen bei akuter, 3 Männer, 4 Frauen bei chronischer Hepatitis) im Alter von 18-72 Jahren (81% zwischen 20 und 50 Jahren) gelangten zur Untersuchung. Die Diagnose war in allen Fällen klinisch und klinisch-chemisch sowie beim größten Teil auch histologisch gesichert. In 33

Fällen (darunter 2 chronischen) konnten AFP-Verlaufsbestimmungen von mindestens 3 Serumproben durchgeführt werden.

4.2.6 Patienten mit Leber-Echinococcus cysticus-Befall

Bei 8 Patienten (4 Jugoslawen, 2 Deutschen, 1 Grieche, 1 Türke: 1m./ 7 w.) wurde aufgrund eines Echinococcus cysticus-Befalls der Leber eine partielle Leberresektion in der Chirurgischen Klinik der Universität München versucht. Bei 2 Fällen mußte die Laparatomie auf eine Inspektion bzw. Hilusdarstellung beschränkt werden. Alle Fälle unterlagen der gleichen Narkosebelastung (Evipan, Neurolept, Lachgas). Bei 6 Fällen wurde eine Hämodilution vorgenommen. Von allen genannten Fällen wurden Serumproben vor Operation und Verlaufskontrollen nach Operation abgenommen und untersucht.

5. ERGEBNISSE

5.1 I s o l i e r u n g d e s A l p h a - F E T O P R O T E I N S

5.1.1 Kartonelektrophorese

Mit Hilfe der präparativen Kartonelektrophorese konnten wir jeweils 12 ml der Ausgangssubstanz (Nabelschnurserum bzw. Serum eines Hepatopatienten) in 2 Kammern pro Lauf verarbeiten. Abbildung 1 zeigt ein Beispiel des gefärbten Abklatschpräparates eines Streifens nach erfolgter Trennung. Die am schwächsten gefärbte der 5 erhaltenen Fraktionen war, entsprechend ihrem niedrigsten Eiweißgehalt am Gesamt-Elektropherogramm, die α_1 -Fraktion (Kartonfraktion K2). Sie enthielt das gesuchte AFP, deshalb wurde bei ihrer Abtrennung von Fraktion K-1 (Albumin) und K-3 (α_2) immer ein etwas breiterer Streifen ausgeschnitten, um den Verlust an AFP möglichst gering zu halten.



Alb. α_1 α_2 β γ

Abb.1 Gefärbter Abklatsch von einem Kartonstreifen nach erfolgter Elektrophorese; Auftrennung bei pH 8,6-Anode links; Auftrag 1 ml Nabelschnurserum.

Die CAF - elektrophoretische Untersuchung der einzelnen Kartonelektrophorese-Fractionen (K-1 - K-5) ergab, daß die erste Fraktion (K-1) nahezu reines Albumin beinhaltet, die 2. Fraktion (K-2) neben hohen Anteilen von α_1 - und α_2 -Globulinen auch relativ große Mengen Albumin, jedoch keine γ -Globuline (Abb.2). Die 3. Fraktion (K-3) besteht hauptsächlich aus α_2 -Globulin, die 4. (K-4) überwiegend aus β_1 -Globulinen und die 5. (K-5) ausschließlich aus γ -Globulinen (Abb.3).

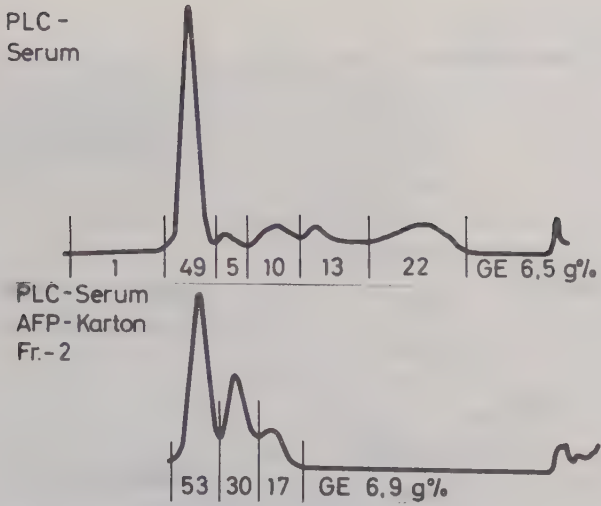


Abb. 2: CAF-elektrophoretische Auftrennung des Vollserums (oberer Abschnitt) und der mittels kartonelektrophoretischer Trennung gewonnenen Fraktion K-2.

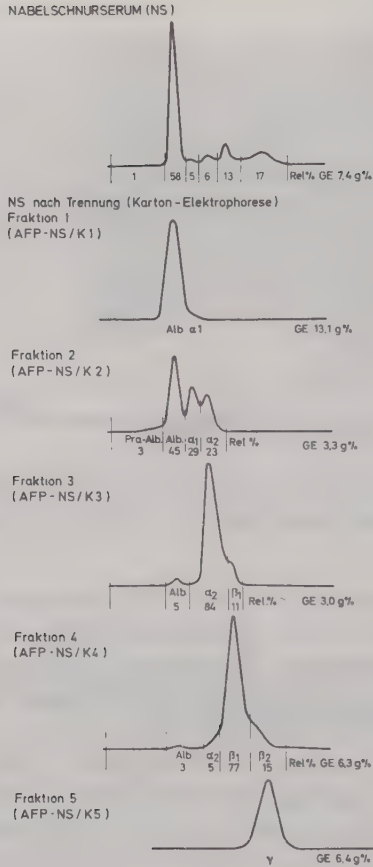


Abb.3: CAF-elektrophoretische Untersuchung der 5 Kartonfraktionen

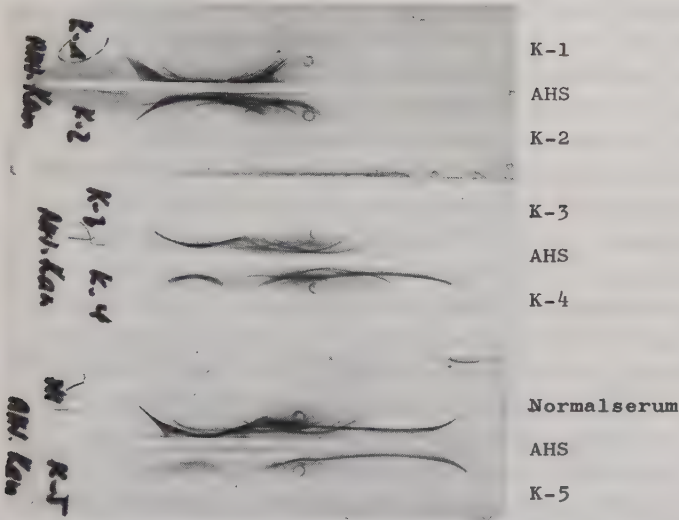


Abb.4: Immunelektrophoresen eines Normalserums und der Kartionfraktionen K-1 - K-5, aufgetragen gegen Anti-Humanserum

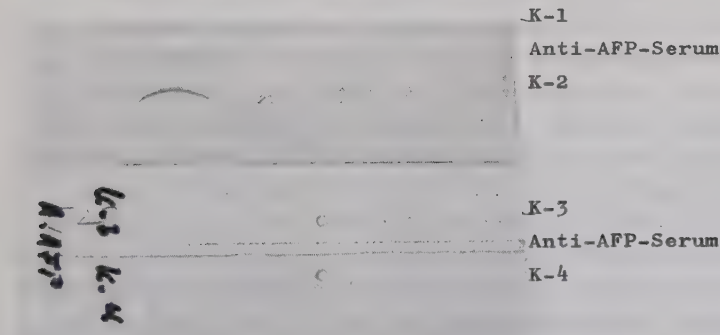


Abb.5: Immunelektrophoresen der Fraktionen K-1 bis K-4, Aufgetragen gegen Anti-AFP-Serum

Mit diesen Ergebnissen stimmen auch die qualitativen Proteinuntersuchungen mittels der Immunelektrophorese (Abb.4 und 5) und der OUCHTERLONY-Methode (Abb.8) überein. Aus ihnen geht hervor, daß das Alpha-Fetoprotein mit seinem größten Anteil in der Fraktion K-2 konzentriert wurde; daneben ging jedoch eine Spur AFP in Fraktion K-1 und K-3 verloren. Als wesentliche Verunreinigung von K-2 waren die Serumproteine Albumin, α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin und α_1 -Glykoproteid sowie inkonstant in Spuren auch α_2 -Coeruloplasmin nachweisbar. Diese Proteine wurden deshalb in den 5 Fraktionen einer Charge quantitativ immunologisch und das AFP auch radioimmunologisch bestimmt. Die Werte sind in Tabelle 3 und Abbildung 6 zusammengefaßt. Sie wurden pro Protein von der gleichen Partigenplatte gewonnen und sind relativ zueinander gut vergleichbar. In Tabelle 2 ist vertikal der Prozentsatz von AFP für die einzelnen Fraktionen an der Summe der in 5 Fraktionen enthaltenen AFP-Menge zu ersehen, er beträgt für K-2 86,4%. Aus der Horizontalen ist z.B. für K-2 ersichtlich, welche hohe Anteile anderer Proteine vorhanden sind. Immerhin zeigten sich 4,3% des Albumins, 17,8% alles gemessenen α_1 -Glykoproteids, etwa die Hälfte des α_1 -Antitrypsins, 22,5% des α_2 -Makroglobulins und 16,7% des Coeruloplasmins in dieser Fraktion. Als Maß für die Reinigungs- und Konzentrierungsfähigkeit der Kartonelektrophorese ist das Verhältnis von AFP- zum Albumin-Gehalt aufschlußreich: es betrug für K-1 1:2771, für K-2 1:17,9 und für K-3 1:329. Das Verhältnis des Albumingehaltes von K-1 zu K-2 betrug 22,2:1, dagegen für den AFP-Gehalt umgekehrt bei 1:7; d.h. in Fraktion K-2 wurde gegenüber K-1 nur etwa 1/22 an Albumin, dafür aber die rund 7-fache Menge an AFP erhalten.

Die Methode der Kartonelektrophorese brachte durchschnittlich einen Verlust an Ausgangsmenge AFP von 24% mit sich. Dieser erklärt sich einmal mit der oben erwähnten Anwesenheit von AFP in den Nachbarfraktionen und muß zum anderen während des Arbeitsvorganges, z.B. beim Auspressen der Kartonstreifen, in Kauf genommen werden. Das Verfahren hat sich damit als eine gut geeignete Trennmethode des AFP vom Albumin erwiesen.

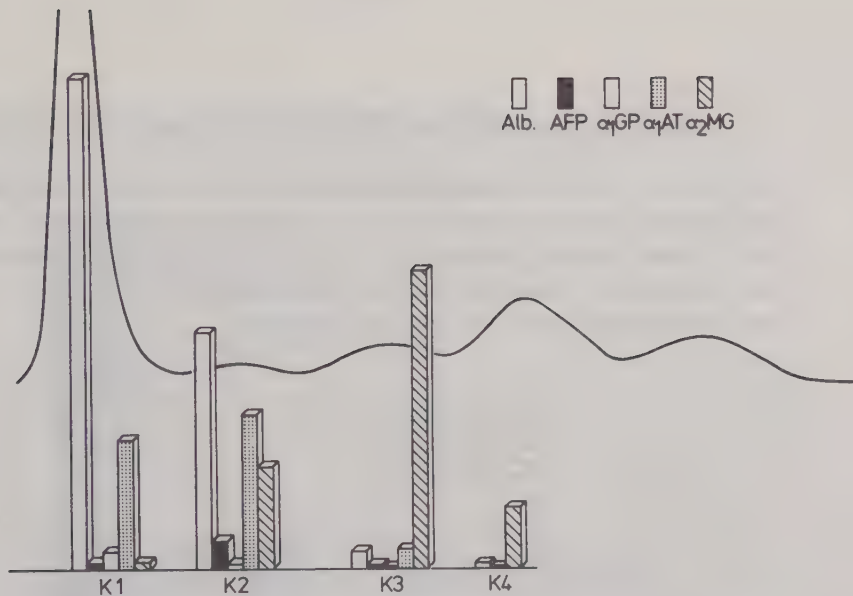


Abb.6: Albumin, AFP und andere Serumproteine in den 5 Fraktionen der Kartonelektrophorese als Absolutmengen in mg, die aus Konzentration und Volumen berechnet wurden.

	mg% Albumin	mg% AFP	mg% α_1 GP	mg% α_1 A-Try	mg% α_2 MG	mg% Coerulo.
K - 1	21.336 95,1%	7,7 12,5%	83 79,6%	593 45,8%	39 2,1%	4 6,6%
K - 2	2.959 4,3%	165,3 86,4%	57 17,7%	1968 49,4%	1291 22,5%	31 16,7%
K - 3	428 0,4%	1,3 1,1%	14 2,7%	276 4,3%	5952 63,9%	212 70,4%
K - 4	88 0,2%	- -	- -	10 0,4%	423 10,8%	8 6,3%
K - 5	21 0,1%	- -	- -	3 0,1%	20 0,7%	- -

Tab.2: AFP und andere Serumproteine in den 5 Kartonfraktionen; in den oberen Reihen die jeweiligen Konzentrationen, in den unteren die Prozentanteile der Summe der in 5 Fraktionen enthaltenen einzelnen Proteinmengen.

5.1.2 Gelfiltration auf Sephadex G 200 und Sephadex G 100

Der nächste Schritt zur Reinigung des AFP bestand in der Molekularsieb-Chromatographie. Mit der Kartonfraktion K-2 von je 2 Läufen wurde jeweils eine Säule (2,5 x 85 cm) beschickt. Ein typisches, 3-gipfliges Chromatogramm zeigt die Abb.7 , die Extinktion wurde bei 280 nm gemessen.

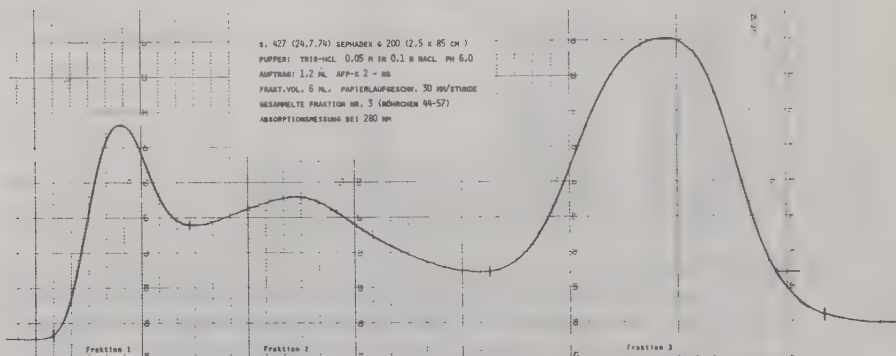


Abb.7: Chromatogramm einer Trennung auf Sephadex G 200

Mit der Immunelektrophorese (Abb.8) und der Doppelgeldiffusionsmethode nach OUCHTERLONY (Abb.9) erfolgte die Identifizierung der in den Elutionsfraktionen enthaltenen Proteine. AFP findet sich nicht in den ersten beiden Peaks, sondern allein in Fraktion 3. Von den höher konzentrierten Serumproteinen enthielt die Fraktion 1 α_2 -Makroglobulin, die Fraktion 2 die meisten in K-2 befindlichen α - und β -Globuline. Fraktion 3, die einzig AFP enthaltene und damit entscheidende Fraktion wies als wichtigste Verunreinigungen Albumin, α_1 -, Antitrypsin, α_1 -Glykoproteid und Coeruloplasmin sowie eine Spur Transferrin auf. Quantitative Konzentrationsbestimmungen von Serumproteinen in den 3 Fraktionen wurden mit der einfachen radialen Immundiffusion nach MANCINI und radioimmunologisch für das AFP durchgeführt. Dabei fielen vom Gesamteiweißgehalt der Fraktion 3

auf Albumin 57%, auf α_1 -Antitrypsin 38% und auf AFP 4%.
Das Verhältnis AFP:Albumin lag mit 1:14 etwas günstiger als bei der Trennung mittels Kartonelektrophorese

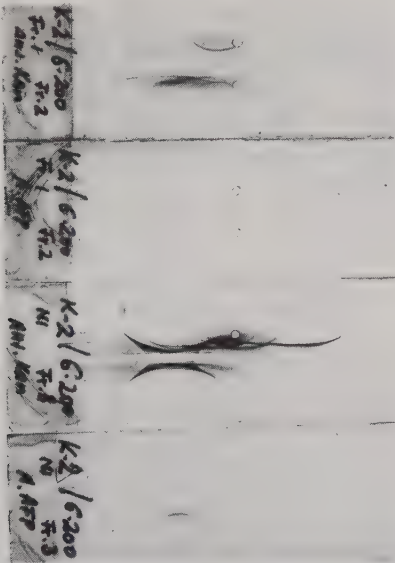


Abb.8: Immunelektropherogramme der Fraktionen 1-3 der Sephadex G 200 Gelfiltration.

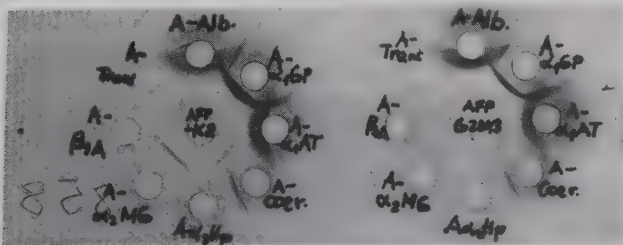


Abb.9: Nachweis der Serumproteine Albumine, α_1 -Glykoproteid, α_1 -Antitrypsin, Coeruloplasmin, α_2 -Haptoglobin, α_2 -Makroglobulin, β_1 A-Globulin und Transferrin in der Kartonelektrophorese K-3 und Sephadex G 200-Fraktion 3 mittels der OUCHTERLONY-Methode.

Von der AFP-Ausgangsmenge (Fraktion K-2) gewannen wir nach diesem Reinigungsschritt durchschnittlich 85% wieder; der diesmal fast ausschließlich dem Arbeitsvorgang zuzuschreibende Verlust betrug demnach 15%.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß es mit dem Verfahren der Gelfiltration möglich ist, α_2 -Makroglobulin aus der AFP-haltigen Fraktion zu eliminieren und den Anteil der anderen Proteine deutlich zu verringern, wobei die Verlustrate an AFP in einem vertretbaren Rahmen bleibt.

5.1.3 Cyan Bromid aktivierte Sepharose - Chromatographie

Im affinitätschromatographischen Endschrift auf der mit monospezifischem Antikörper gegen AFP gekoppelten CNBr akt. Sepharose 4 B-Säule trennten wir die Fraktionen 3 von Sephadex G 200. Bei Volumina von 1 - 1,5 ml konnten wir jeweils etwa 1 mg AFP auf die Säule auftragen. Insgesamt wurden 14 Läufe durchgeführt, wozu wir drei Säulen vorbereiten mußten, da jede Säulenfüllung nach 5-maligem Gebrauch (Aufbewahrung bei 4°C) wegen der möglichen Proteinzerstörung verworfen wurde.

Das Chromatogramm (Abb.12) zeigt nach einem kleinen Vorpeak (Salze) einen steilen und hohen Proteinpeak (Fr.1). Unter dem Nachwaschen mit dem Trispuffer bleibt die Elutionsextinktion auf dem Ausgangsniveau, und erst nach dem Pufferwechsel wird mit dem Erscheinen des stark sauren Glycin-Puffers im Eluat ein neuer Peak sichtbar, der nach steilem Anstieg sehr flach ausläuft. Dieser wurde entweder insgesamt gesammelt (Fr.3) oder nach einmal unterteilt (Fr. 3 und Fr.4). Dem kleinen scharfen Peak nach erneutem Umstellen auf den Startpuffer entspricht wahrscheinlich ausgewaschenes IgG-Globulin vom Kaninchen oder dessen Bruchstücke, das sich von der Säulenmatrix gelöst hat. Eine Identifizierung war nicht möglich.

CNBr-aktiv Sepharose 4B Säule Nr.8/3 (15 x 1,7 cm)

Auftrag : 1,3 ml Peak 3 (G 200/3 NS) $\frac{1}{2}$ 1,2 mg AFP

Startpuffer : 0,2 M Trispuffer pH 8,0 in 0,5 M NaCl

Endpuffer : 0,2 M Glycin HCl pH 2,8 in 0,5 M NaCl

Elutionsgeschwindigkeit: 0,5 ml/min. Schreiber - Papierschub 120 mm/Std

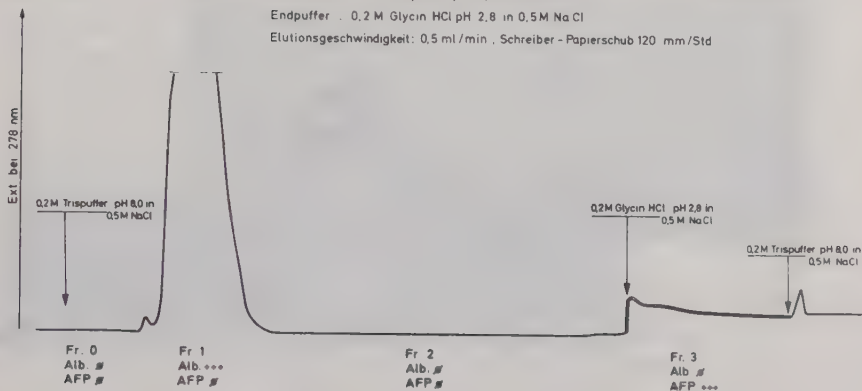


Abb.12: Diagramm der CNBr akt. Sepharose Chromatographie

Durch die OUCHTERLONY-Untersuchung (Abb.13), bei der mit einem Antiserum gegen die meisten im Serum vorkommenden Proteine und mit monospezifischem Anti- AFP-Serum geprüft wurde, konnte das Fehlen von AFP in Fraktion 1 und Fraktion 2 sowie das Fehlen anderer Proteine bis auf AFP in den Fraktionen 3 und 4 bewiesen werden. Die AFP-Konzentration betrug in Fraktion 3 zwischen 50 und 80 mg/100 ml. Ferner zeigt sich auf Abb. 13 im Ansatz mit Anti-AFP-Referenzantiserum eine deutliche Identitäts-Reaktion zwischen dem aus Nabelschnurserum gewonnenen reinen Fetal-AFP und dem als positive Kontrolle verwandten Patientenserum (primäres Leberzellkarzinom), welches Tumor-AFP enthielt. Somit konnte durch die beschriebenen Verfahren immunologisch reines α -Fetoprotein gewonnen werden.

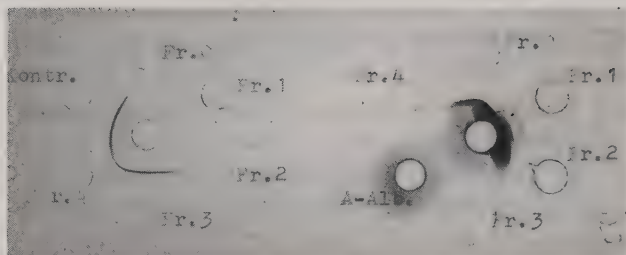


Abb. 13: OUCHTERLONY -Untersuchung der Fraktionen eines Laufes auf CNBr aktivierter 4B-Säule. Links zentral: Anti - AFP Serum (monospezifisch), rechts zentral: Anti Human Serum

Der Ertrag an reinem AFP lag bei dieser Methode der Affinitätschromatographie zwischen 10,6 und 74,3% bei einem Mittelwert von 46%. Die hohen Verluste von bis zu 90% mußten wir jeweils bei den ersten beiden Läufen einer frisch gegossenen Säule beobachten, während in den folgenden die Wiedergewinnung zu den erwähnten Werten anstieg.

Quantitative Bilanz der Isolierung

Die durchschnittlichen AFP-Wiedergewinnungsraten der Kartonelektrophorese von 76%, der Sephadex-Gelfiltration von 85% und der Affinitätschromatographie mit CNBr akt. Sepharose von 46% ergeben einen definitiven Ertragsprozentsatz von 29,8% der Ausgangsmenge. Bei einem Arbeitsdurchgang, wo wir vom Nabelschnurserum (gepoolt) bis zur CNBr-Fraktion 3 alle Schritte quantitativ verfolgten und der letzte Schritt mit einem Verlust von nur 23,7% einherging, erreichten wir eine Ausbeute von 48%.

5.1.4 Physikalisch-chemische Charakterisierung

Die immunoelektrophoretischen Untersuchungen (Abb. 4 und 8) beweisen die elektrophoretische α_1 -Mobilität des α -Fetoproteins.

100 µg lyophilisiertes AFP wurde in der Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese untersucht¹. Die Wiedergabe des Gelzylinders (Abb.14) zeigt eine deutliche Hauptbande sowie die Spur einer zweiten Bande.

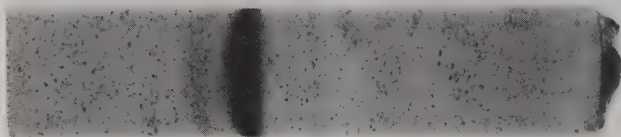


Abb.14: Gefärbtes Polyacrylamid-Präparat (Disc-Elektrophorese) einer aufgetragenen Charge von CNBr.Fr.3, ca. 100 µg lyophilisiertes AFP enthaltend.
Anode: links

Ebenso wurden 50 µg lyophilisiertes AFP einer anderen Charge mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Platte² untersucht. Dabei zeigte sich ebenfalls eine dichte Hauptbande mit kleiner Nebenbande (Diagramm Abb.15), die wahrscheinlich einem Dimer von AFP entspricht (s. dazu S.80). Die Molekulargewichtsbestimmung an Hand der Vergleichssubstanzen (Cytochrom C, Catalase, BSA, Phosphorylase A, IgG vom Kaninchen) ergab für die Hauptbande ein Molekulargewicht von $67\,000 \pm 2\,000$.

1 Durchgeführt im Stoffwechsellabor der I.Med.Klinik der Universität München, Laborleiter: PD Dr.P.Schwandt.

2 Die Untersuchungen erfolgten im Physiologisch-chemischen Institut der Universität München durch Herrn Dr. Werner.

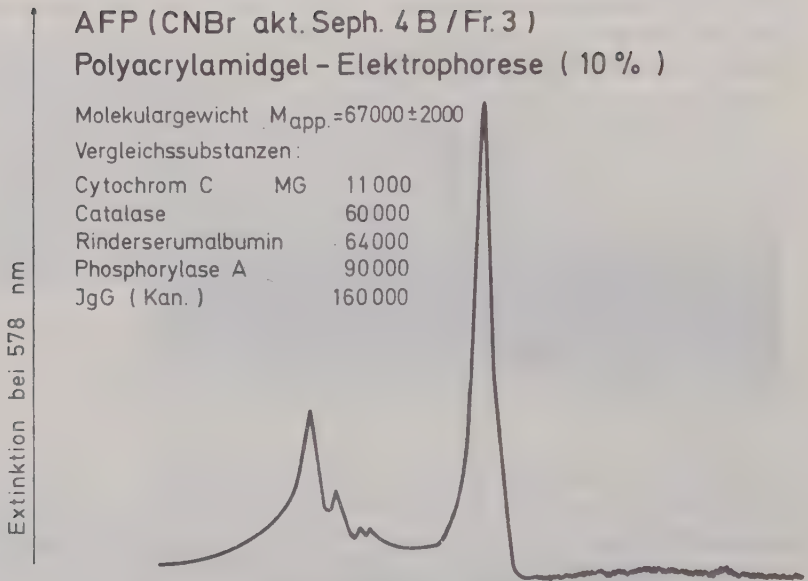


Abb. 15

5.2 Herstellung des monospezifischen Antiserums

Die Immunisierungsversuche mit den AFP-Präparaten aus dem Reinigungsschritt auf CNBr. aktivierter Sepharose 4B führten zu einer ausgeprägten Antikörperbildung gegen AFP. Bei der Prüfung der Antiseren auf OUCHTERLONY-Platten zeigten sich Präzipitationslinien gegen AFP-positive Seren, die mit den Linien der AFP-Antikörper der Fa. Behringwerke fusionieren, und außerdem noch weitere Linien, jedoch nicht gegen Albumin (Abb. 16a). Nach Adsorption mit lyophilisiertem menschlichen Normalserum waren nur noch AG/AK-Reaktionen gegen AFP nachweisbar (Abb. 16a+b).

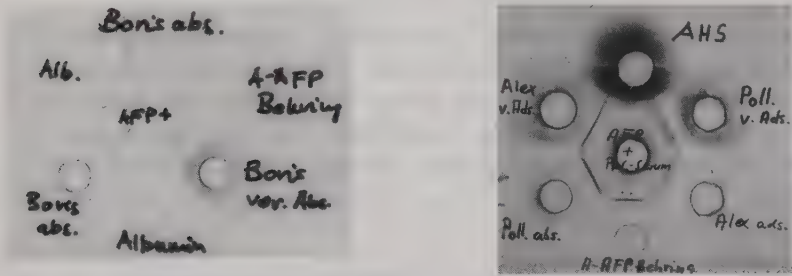


Abb.16: Testung der Antiseren auf OUCHTERLONY-Platten gegen AFP-positives Patientenserum (PLC) und Albumin;
a) von Kaninchen "Boris"
b) der Kan. "Alex" und "Pollux", vor und nach Adsorption.

Zur Isolierung des Antikörpers von weiteren Serumproteinen trennten wir die absorbierten Antiseren auf DEAE-Cellulose präparativ auf, Abb.17 zeigt ein typisches Beispiel eines Chromatogramms.

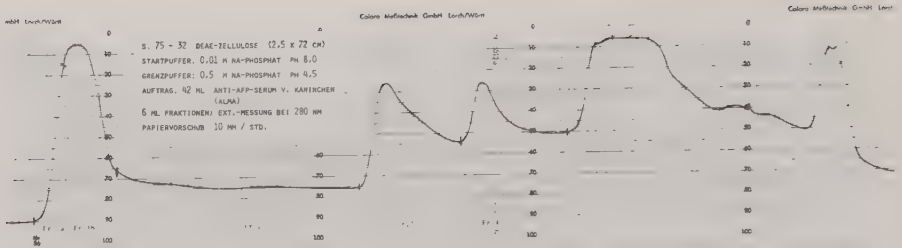


Abb.17: Säulenchromatogramm eines DEAE-Anionenaustauschers zur Trennung eigenen AFP-Antiseraums.

Die Prüfung der verschiedenen Fraktionen erfolgte mittels der CAF-Elektrophorese (Abb.18), der Immunelektrophorese (Abb.19) und der OUCHTERLONY-Methode (Abb.20). Dabei erwiesen sich die Fraktionen 1 und 2 des chromatographierten Antiseraums als reine IgG-Fraktionen, während erste Verunreinigungen in den folgenden Fraktionen auftraten. α -Fetoprotein fand sich in allen Fraktionen Ia - IV, Reaktionen gegen menschliches Normalserum wurden in keinem Fall beobachtet.

Anti - AFP - Serum vom
Kaninchen (Alma)

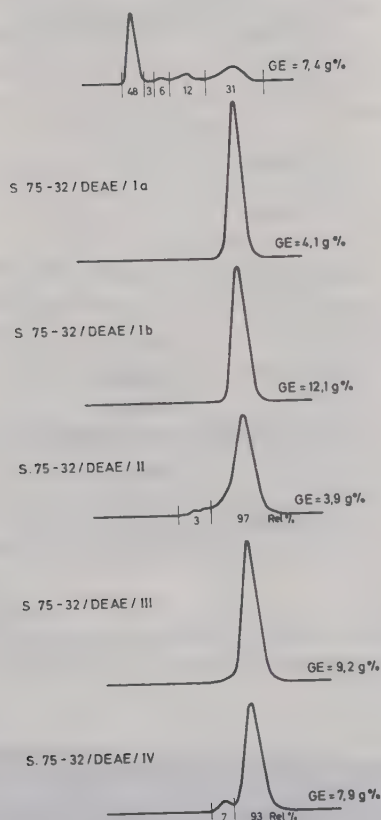


Abb. 18: CAF-elektrophoretische Untersuchung der ersten vier Fraktionen eines säulenchromatographisch (DEAE-Cel- lulose) aufgetrennten eigenen Anti-AFP-Serums. Anode linksseitig, Auftrennung bei pH 8,6.

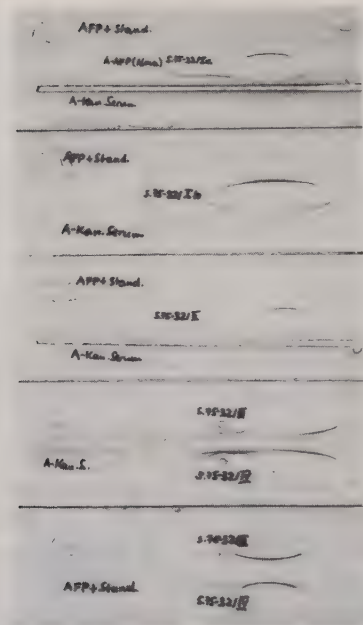


Abb. 19: Immunelektrophoretische Untersuchung der Fr. Ia-IV der DEAE-Cellulose-Chromatographie von eigenem AFP-Antiserum.

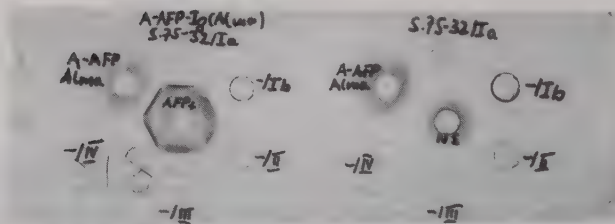


Abb. 20: OUCHTERLONY-Untersuchung der DEAE-Fractionen auf Antikörper gegen AFP und gegen humanes Normalserum.

Die reinsten antikörperaktiven Fraktionen wurden gepoolt und sowohl für den Radioimmunoassay als auch für neue CNBr-aktivierte Sepharose 4B-Säulen verwandt. Die weniger reinen antikörperaktiven Fraktionen wurden für immunologische Untersuchungen benutzt. Von den bisher immunisierten 4 Kaninchen ("Boris", "Alex", "Pollux", gepoolt zu A/P und "Alma") wies Boris den stärksten Antikörpertiter auf.

Nach dem Prinzip der einfachen radialen Immundiffusion wurden verschiedene Antiseren semiquantitativ verglichen, wobei gleiche Lösungsmengen (teilweise verdünnt) in ein mit AFP-haltiges Gel diffundierten. Nimmt man unsere Referenz, den AK der BEHRINGWERKE, als 1, so ergeben sich für die einzelnen Antiseren und IgG-Fraktionen folgende Werte:

Nr	Aniserum	GE g%	-faches d.Referenz
1	A-AFP Behringwerke		1
2	"		0,33
3	"		0,16
4	AS v.Boris	1,75	4,5 fach
5	IgG Fr.I v.Boris	11,5	25 "
6	AS d.Fa. Medac		0,86 "
7	AS v. Alex	1,1	1,0 "
8	AS v. Pollux	1,9	2,2 "
9	AS Alex/Pollux	1,46	1,5 "
10	A/P IgG Fr.I	6,6	6,5 "
11	A/P IgG Fr.II	3,3	2,2 "

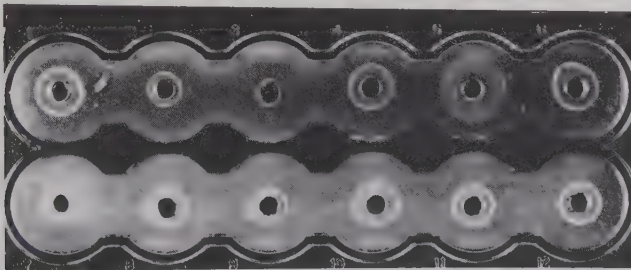


Abb.21: Untersuchung verschiedener eigener Anti-AFP-Seren und IgG-Fraktionen im Vergleich zu einem kommerziellen Anti-AFP-Serum(Fa.Behringwerke)und einer Anti-IgG-AFP-Charge (Fa.Medac) in der umgekehrten einfachen radialen Immundiffusion.

Die Antikörpereigenschaft der Seren und Fraktionen waren nicht allein von ihrer Konzentration abhängig; bei den DEAE-Cellulose-Fractionen wiesen die Fraktionen I sowohl bei Boris als auch beim A/P-Pool die auch relativ höchste Antikörperpotenz auf.

Aufgrund dieser Ergebnisse der Monospezifität und der höchsten Affinität zum AFP wurden die Fraktionen I für den Radio Immuno Assay verwandt.

5.3 Herstellung des Radioimmuno Assay

5.3.1 Markierung

5 µg AFP wurden jeweils mit radioaktivem J^{125} (0,2 mCi) gekoppelt. Die Menge ermittelten wir durch Abwiegen der entsalzten und lyophilisierten CNBr.-Fraktionen, die dann in 0,05 mol Phosphatpuffer so gelöst wurde, daß sich die gewünschte Konzentration (5 µg in 20 µl) einstellte. Deren Richtigkeit bestätigte die quantitative Bestimmung auf M-Parti-genplatten.

Bei allen Markierungen zeigte sich nach Chromatographie des Markierungsgemisches auf Sephadex G 50 ein schmaler, steiler Proteinpeak, welcher nach 6-10 ml Eluat (je nach Säulenhöhe) seinen Gipfel erreichte. Der zweite Peak variierte an Breite und Höhe mehr als der erste; er repräsentiert die nicht gebundene Aktivität, markierte Proteinbruchstücke und Salze. Wie auch im Diagramm (Abb.22) angegeben, war die Aktivität auf beiden Peaks immer etwa gleich verteilt. Die Proteinfraction mit der herausragend hohen Zählrate (im Diagramm schwarz) wurde anschließend auf Sephadex G 100 rechromatographiert. Von dem resultierenden Peak poolten wir anfangs je zwei ansteigende Gipfel-, und absteigende Elutionsfraktionen, die wir in Testansätzen auf ihr Bindungsoptimum mit dem ersten Antikörper hin prüften (s. umseitig).

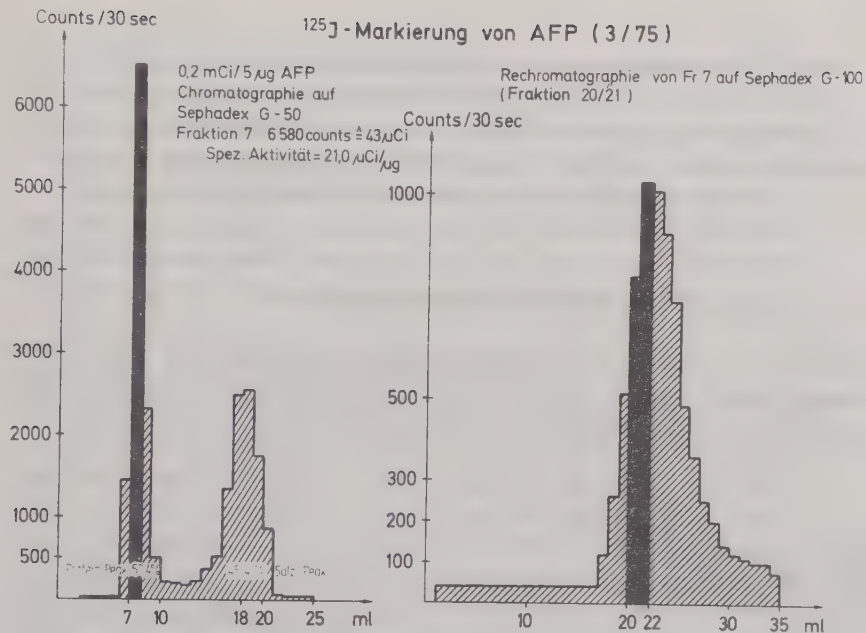


Abb.22: Säulenchromatogramme der Gelfiltration einer markierten AFP-Fraktion auf Sephadex G 50(links) und G 100 (rechts)

Die Berechnungen ergaben bei einem typischen Markierungsvorgang einen Verbleib an Aktivität (und ebenso Protein) im Reaktionsgefäß und Pipettenspitze von 30%. Im Proteinpeak maßen wir 50,4% (70,5 μCi , 3,5 μg AFP), im Salzpeak 45,5% der übrigen Aktivität. Die weiterverwandte Fraktion 7 enthielt mit 58,3% der Peakaktivität 43 μCi und 2,04 μg AFP, was einer spezifischen Aktivität von 21,0 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ AFP entsprach.

Bei der Rechromatographie errechneten wir für die aufsteigende und höchste Fraktion (gepoolt) eine Aktivität von 10,7 μCi bei einem AFP-Gehalt von 518 ng.

Nach dieser Berechnung wurden die beiden Fraktionen 20/21 (2 ml) auf 100 ml Gesamtvolumen mit RIA-Verdünnungspuffer gebracht, sodaß wir eine Konzentration von 5,1 ng/ml AFP erreichten, was sich gegenüber der Standard-AFP-Konzentration in der RIA-Standardkurve als günstig erwies.

5.3.2 Erste Antikörper-Verdünnungskurven

Die oben erwähnten 3 Pools der aufsteigenden Gipfel- und absteigenden Peak-Fractionen wurden auf ihre Fähigkeit, mit dem AFP-Antikörper eine Bindung einzugehen, untersucht.

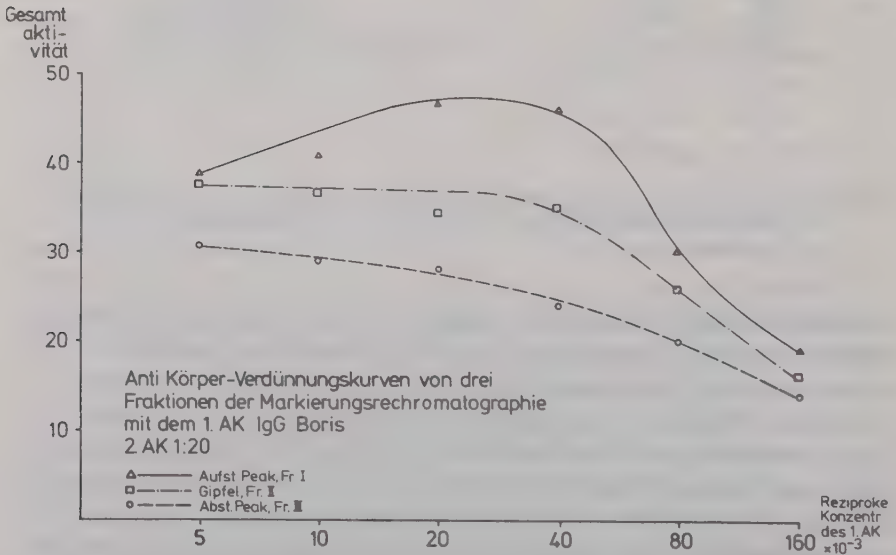


Abb. 23: AK-Verdünnungskurven von 3 Fraktionen der Markierungsrechromatographie bei gleichem Antiserum.

Dazu stellten wir 3 Test-Ansätze mit den verdünnten ¹²⁵AFP-Fraktionen und einer AK-Verdünnungsreihe, wie auf Seite beschrieben, her. Das Antiserum (IgG"Boris") wurde in Verdünnungen von 1:5 000 bis 1:160 000 mit dem markierten Antigen inkubiert, die prozentuale Bindung gegen die AK-Verdünnung in ein Koordinatensystem eingetragen (Abb.23). Da die aufsteigende Fraktion die höchste Bindung aufwies, verwandten wir diese für den Radio Immuno Assay.

Mit ihr testeten wir auch die drei Antiseren "Boris", "A/P" und "Alma", von denen wir Verdünnungen 1:1 000 bis 1:2.260.000 herstellten. Die drei Verdünnungskurven sind in Abb. 24 wiedergegeben. Das IgG "Boris" behält bis zum Verdünnungsgrad 1:40 000 seine optimale Bindung von 45%, und noch bei 1:2,56 Mill. ist eine Bindung feststellbar. Die beiden anderen AS zeigten eine höhere Bindungskapazität (50%), gingen jedoch bei geringeren Verdünnungsgraden mit der Bindung herunter.

Für den RIA wurde die Verdünnung des 1.Antikörpers (IgG"Boris") mit 1:120.000 festgelegt, da diese eine nicht optimale Bindungskapazität besitzt (etwa 70% davon) und bei Standard-verdrängungskurven mit Antiseren verschiedener Konzentrationen den steilsten Verlauf zeigte.

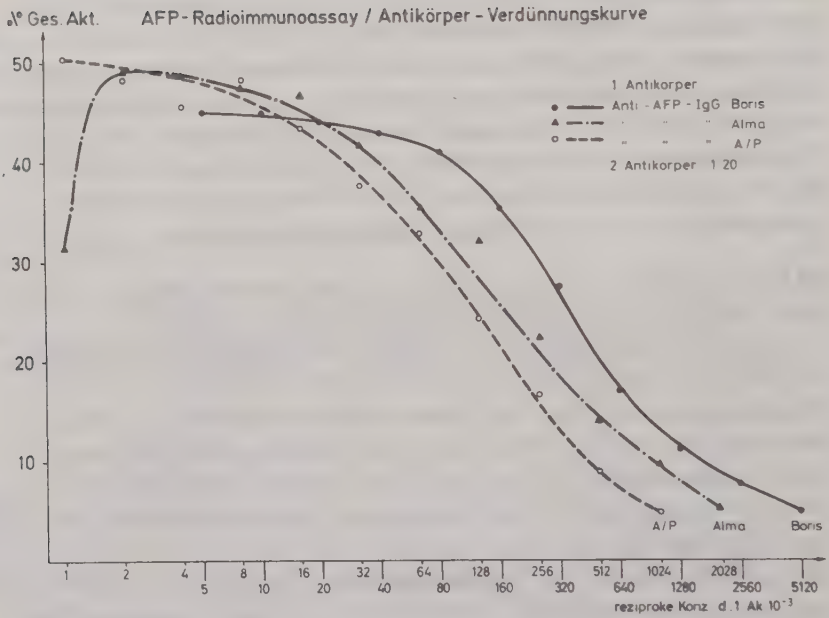


Abb. 24: AK-Verdünnungskurven mit drei verschiedenen Antiseren bei gleichem ¹²⁵AFP.

5.3.3 Standard-Verdrängungskurven

Ein besonderes Problem bei der Herstellung einer reproduzierbaren Standardkurve bereitete uns die Beschaffung einer geeigneten AFP-Konzentrationslösung. In Ermangelung einer international festgelegten und gültigen Eichsubstanz orientierten wir uns an dem Standard der Fa. ABBOT. An diesem eichten wir eine Verdünnung unserer reinen AFP-Fraktion, daneben wurden auch Verdünnungen von PLC-Serum, Nabelschnurserum und AFP-Standard der Fa. BEHRINGWERKE (für M-Partigenplatten) getestet. Gegenüber den oben genannten erwies sich die AFP-Fraktion der CNBr-Reinigung als die geeignetste, ihre Verdrängungskurve zeigt die Abb. 25. Zum Vergleich sind hier Kurven mit dem Standard der Fa. ABBOT (320 ng), der Fa. IDW (160 ng/ml), der Fa. BEHRINGWERKE und der eigenen Eichlösung wiedergegeben. Die Konzentration ist logarithmisch, die Prozente der gebundenen Aktivität zu der des 0-Wertes numerisch aufgetragen. Die Kurven stammen aus verschiedenen Testansätzen. Es zeigt sich dabei deutlich, daß das eigene isolierte und markierte Antigen mit dem AFP anderer Herkunft gleichartig um die Bindungsstellen am Antikörper konkurriert und verdrängt wird. Die eigene Standardsubstanz reagiert dabei vergleichbar zu denen der anderen Firmen.

Die höchste Genauigkeit - angegeben durch die Steilheit der Kurve - erreichten wir mit allen Standardverdünnungsreihen im Bereich von 10 - 80 ng/ml, während die Grenzbereiche deutlich abflachende Verläufe aufweisen. Diese Tatsache wird bei dem Logit/Log-System berücksichtigt. Die prozentualen Bindungswerte (B/B_0) werden in logits ($1 = \frac{\ln p}{100-p}$) aufgetragen,

die Konzentrationen wiederum logarithmisch, wobei die obige Kurve in eine Gerade mit optimal definierter Steigung ($B=-2,3$) übergehen sollte. (Typische Gerade mit den dazu gehörigen Gleichungen Abb. 26 a+b).

Während wir zur Auswertung von Analysenlösungen die raschere Ablesung von der Kurve bevorzugten, wurde zum Vergleich der Tests von allen auch die Gerade gezeichnet und mit einem eigenen Programm berechnet.

AFP-Radioimmunoassay München (3/75)

Standardkurve B.K. 32 %

N-Wert 1,8 % ; 1. Antikörper 1:120000

2. Antikörper 1:20

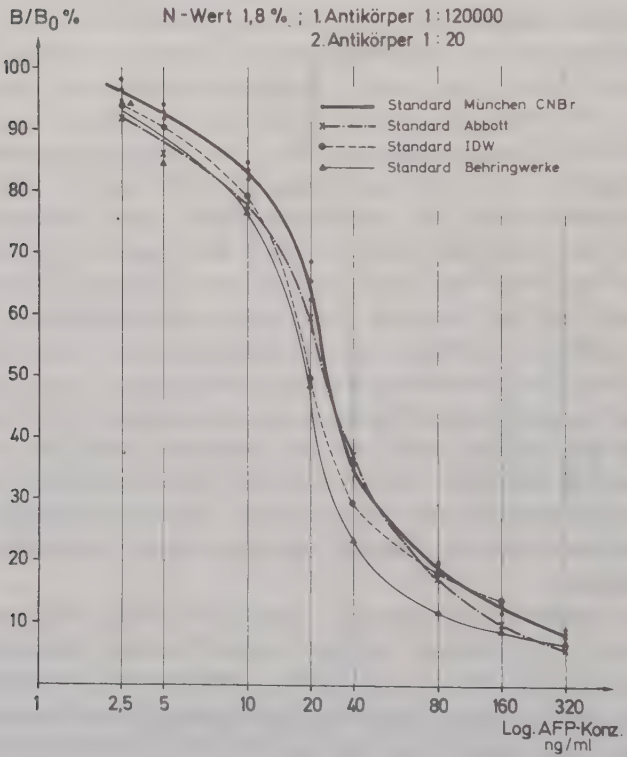


Abb. 25: Vier Standard-Verdrängungskurven von Standards verschiedener Herkunft, hergestellt im eigenen RIA.

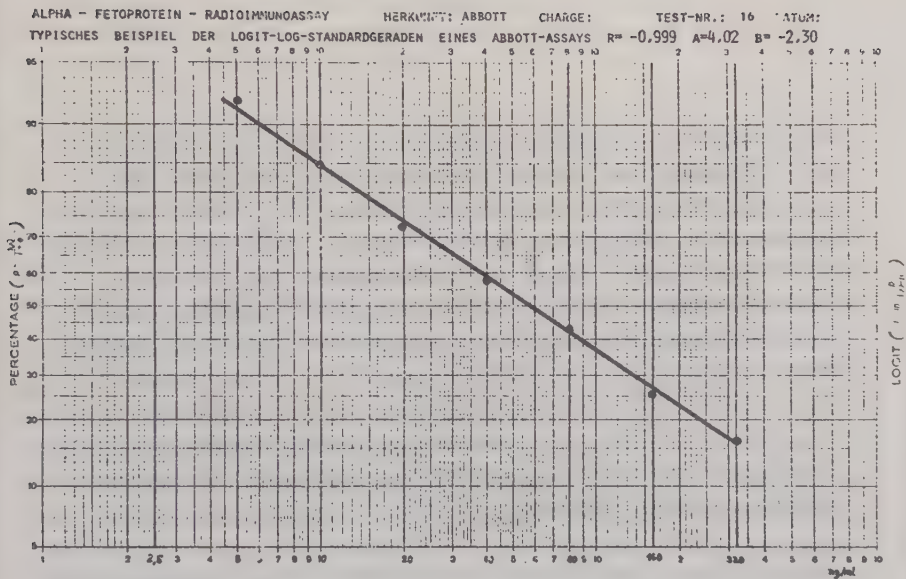


ABBILDUNG 26 a

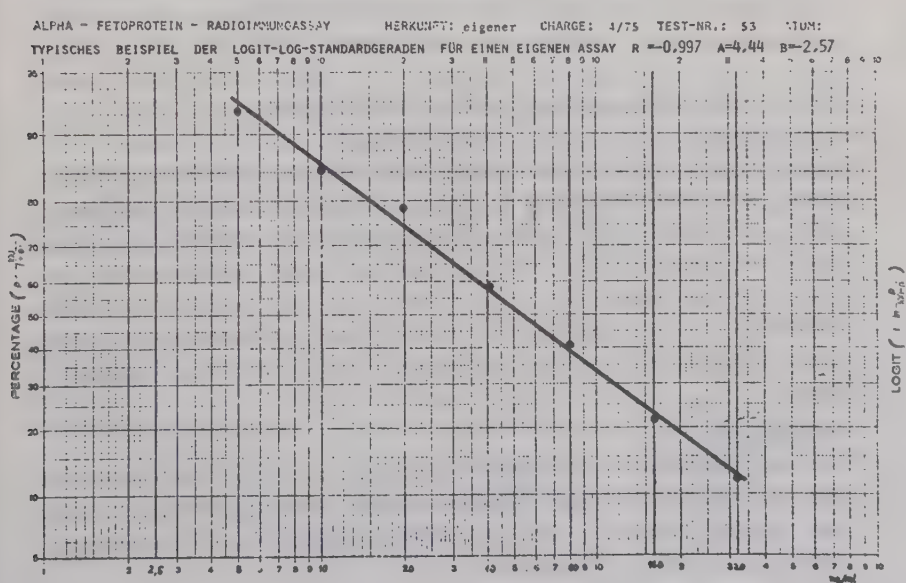


ABBILDUNG 26 b
Standard-Logit/Log-Inhibitionsgeraden eines kommerziellen (Abb. 26 a: Fa. ABBOTT) und eigenen (Abb. 26 b) AFP-Radioimmunoassays. Eingetragene Punkte entsprechen den Mittelwerten von Doppelbestimmungen der entsprechenden Standards.

Nach dem Logit-Log-Verfahren erhielten wir für 23 Tests der Fa. ABBOTT bei Korrelationskoeffizienten zwischen - 0,979 und -0,999 und einem mittleren $s_{y \cdot x}$ -Wert von 0,096 einen A-Wert von im Mittel $3,92 \pm 0,53$ (VK 13,5%) und B-Wert von $- 2,26 \pm 0,21$ (VK 9,2%).

Entsprechende Werte für eigene 24 Assays bei Korrelationskoeffizienten zwischen - 0,993 und - 0,999 und einem mittleren $s_{y \cdot x}$ von 0,079 betrugen für A (Ordinatenabschnitt) $4,51 \pm 0,76$ (VK 16,9%) und für B (Steigung) $- 2,62 \pm 0,33$ (VK 12,5%). Für diese Tests lagen die N-Werte (unspezifische Bindung) zwischen 1 und 3,1% und die Bindungskapazität im Mittel bei $22,1 \pm 8,4$.

Abb. 27 zeigt eine Standard-Inhibitionskurve der gemittelten Standard-Aktivitätswerte aus 10 verschiedenen AFP-Radio Immuno Assays unter Verwendung der jodmarkierten AFP-Substanzen aus vier verschiedenen Markierungen.

5.3.4 Kontrollen - Spezifität - Haltbarkeit

Kontrollen

Identische Kontrollseren, die in 10 Testen gemessen wurden, lagen zwischen 102 und 150 ng/ml mit einem Mittelwert von $122 \pm 17,8$ ng/ml und einem Variationskoeffizienten von 14,6%. Dieselbe Kontrolle 10-fach innerhalb eines Testes untersucht, ergab einen Mittelwert von $105 \pm 2,1$ ng/ml (VK 2,0%), während eine niedrigere Serumprobe bei der Zehnfachbestimmung einen Mittelwert von $57 \pm 2,4$ ng/ml (VK 4,2%) zum Ergebnis hatte.

Spezifität

Bei der Prüfung auf eventuelle Kreuzreaktionen beobachteten wir von einer 4 g%igen Albumin-Lösung (lyophilisiertes humanes Albumin "reinst" der Fa. BEHRINGWERKE) eine Verdrängung zwischen 0 -6% des Leerwertes.

Haltbarkeit

Da das J^{125} eine Halbwertszeit von 60 Tagen besitzt, verwandten wir das markierte AFP nicht länger als 6 Wochen nach Erhalt

des radioaktiven Jodids, zumal es auch zu einer Beeinflussung der Immunreaktivität des markierten Antigens nach diesem Zeitraum kam. Die zum RIA-Gebrauch mit Verdünnungspuffer verdünnten Lösungen wurden in 10 ml-Portionen (entsprechend 90 - 100 Einzelbestimmungen) im gefrorenen Zustand bei -70°C aufbewahrt. Pro Markierung erhielten wir zwischen 100 und 200 ml ^{125}J -AFP-Lösung entsprechend 500-1000 Doppelbestimmungen.

Vergleich mit anderen Standards

Neben dem AFP-Standard der Fa. ABBOTT, an dem wir unseren eigenen Standard (CNBr.) eichten, untersuchten wir auch die Standardlösungen von zwei noch nicht im Handel befindlichen AFP-Radioimmunoassays der Fa. IDW und der Fa. SERONO sowie den Standard der Fa. BEHRINGWERKE. Für den Standard SERONO (Sollwert 16 ng/ml) fand sich eine gute Übereinstimmung. Für Standard IDW ergab sich bei wiederholten Bestimmungen in 5 Tests ein Mittelwert von 192 ng/ml mit der relativ großen Standardabweichung von 42 ng/ml (Bereich 135-250 ng/ml) und einer Abweichung vom Sollwert (160 ng/ml) von + 18,8%. Der Standard der Fa. BEHRINGWERKE (für M-Partigenplatten) wurde mehrfach in einer Verdünnung von 1:1000 radioimmunologisch untersucht, und wies stets Konzentrationen zwischen 240 000 und 260 000 ng/ml (Sollwert 25 mg% = 250 000 ng/ml) auf.

ALPHA - FETOPROTEIN - RADIOIMMUNOASSAY

HERKUNFT: eigener CHARGE: 1/75-4/75 TEST-NR.: \ . DATUM:
STANDARKURVE AUS DEN MITTELWERTEN DER STANDARDS VON 10 VER-
% of activity bound to 'zero' samples SCHIEDENEN TESTEN AUS 4 MARKIERUNGEN

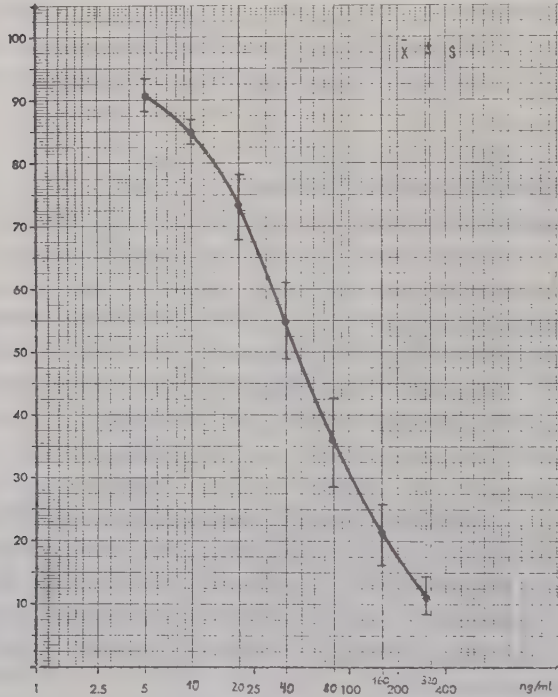


Abb.27: Standard-Inhibitionskurve der gemittelten Standard-Aktivitätswerte aus 10 verschiedenen AFP-Radioimmuno-Assays unter Verwendung von ^{125}J -AFP aus vier verschiedenen Markierungen.

5.4 Ergebnisse der klinischen Untersuchungen

5.4.1 Normalwerte

Bei 121 Seren (das sind 86,4%) des Kontrollkollektivs (N=140) wurden AFP-Serumkonzentrationen unter 5 ng/ml gemessen; die restlichen 19 (13,6%) lagen zwischen 5 und 14 ng/ml (s. Abb.28). Eine genauere Bestimmung der 121 Werte war wegen der hier grenzwertigen Empfindlichkeit unseres Radioimmunoassays nicht möglich. Auch eine Parallel-Untersuchung von 100 Normalseren im AFP-Radioimmunoassay der Fa. SERENO mit einer unteren Empfindlichkeit bei 0,6 ng/ml wies über 50% der Werte als unter 0,6 ng/ml liegend aus, sodaß angenommen werden muß, daß viele Normalspiegel bei 0 ng/ml liegen und insgesamt wahrscheinlich asymmetrische linksschiefe angenäherte logarithmische Verteilung vorliegt.

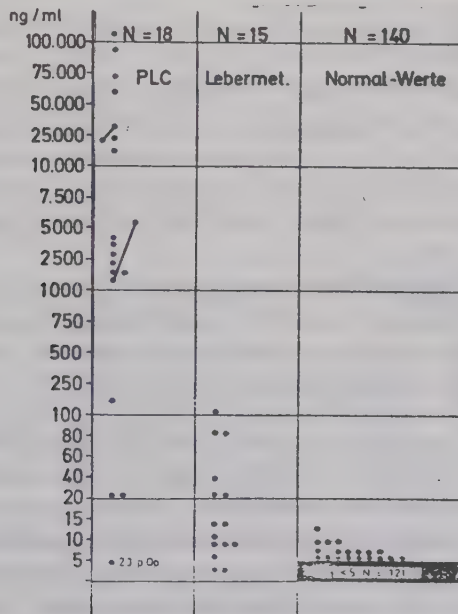


Abb.28: AFP bei malignen Lebererkrankungen im Vergleich zur Norm

5.4.2 AFP bei primären Leberzellkarzinomen

Die AFP-Bestimmungen bei 18 Patienten mit Hepatom ergaben bei 7 Patienten (39%) Werte über 10 000 ng/ml. Diese waren somit nach der Doppel-Gel-Immundiffusion nach OUCHTERLONY, gegebenenfalls nach Einengung des Serums, positiv. Abb.28 zeigt das Beispiel einer solchen Untersuchung bei einem Hepatom-Patienten im Vergleich zu einer positiven Kontrolle.

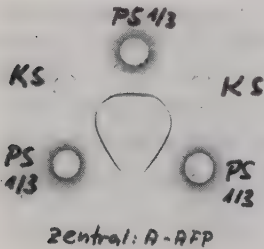


Abb.28a: AFP-positives Serum eines PLC-Patienten nach der OUCHTERLONY-Methode.

PS=Patientenserum, 3-fach eingengt

KS=Kontrollserum

Sehr stark erhöhte AFP-Spiegel zwischen 1500 und 6640 ng/ml wurden bei 7 Patienten gefunden, dagegen wiesen 3 Patienten nur mäßige Erhöhungen (zwischen 21 und 120 ng/ml) auf. Der mit 5 ng/ml im Normbereich liegende Wert stammt von einer Patientin (36 J.), bei der 2 Jahre vor der Serumuntersuchung ein malignes Hepatom histologisch diagnostiziert und anschließend der linke, tumorinfiltrierte Leberlappen reseziert wurde.

Kontrollbestimmungen erfolgten in 2 Fällen: bei einem stieg der AFP-Spiegel innerhalb von 3 Wochen von 2,2 mg% auf 3 mg%, im anderen von 1167 ng/ml nach 5 Wochen auf 6638 ng/ml; beide Patienten starben wenige Wochen später.

Von den zusätzlich erreichbaren klinisch-chemischen Serumparametern bestand, soweit wegen der geringen Fallzahl überhaupt statistisch verwertbar, keine signifikante Korrelation zum AFP-Spiegel, wie z.B. bei Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit, CAF-Elektrophorese-Diagramm, Transaminasen-, Bilirubin- und alkalische Phosphatase-Spiegel. Die alkalische Phosphatase war bei allen Patienten auf Werte über die Norm bis

zu 500 mU/ml erhöht (Norm bis 190 mU/ml).

Zur Tumorgroße bzw. dem Ausmaß an Durchsetzung der Leber mit tumorzellhaltigen Infiltraten fanden wir bei den vorliegenden 6 Sektionsfällen (Tab.4) keine Abhängigkeit des AFP-Serumspiegels. Ein 8 x 10 x 10 cm großer Einzeltumor (Fall Nr.6) ging mit einer AFP-Serumkonzentration von 2408 ng/ml einher, welche in einem anderen Fall (Nr.3) mit einem metastasierenden PLC mit ausgedehnter zentraler Tumornekrose nur 22 ng/ml betrug.

SEKTIONSBEFUNDE UND AFP-SERUMSPIEGEL BEI 6 PATIENTEN MIT PRIMÄREM LEBERZELLKARZINOM

Nr., Patient Geschlecht Alter	Lebertumor-Befund	LK-Befall	Metastasen	AFP-Konz. ng/ml
1. A. S. männl. 68 J.	Mehrere Tumorknoten, Grösse bis 8 x 7 cm Ø Histol.: adenopapilläres o. cholangiozell. prim. Leberzellkarzinom (PLC)	para-tracheal aortal, pankreat.	Lunge	1800
2. L. B. männl. 79 J.	Mehrere bis 6 cm Ø grosse Knoten. Histol.: wenig differenziertes, gallebildendes PLC	diffus	rechter Lungenoberl.	170000
3. J. B. männl. 79 J.	PLC des rechten Leberlappens ausgedehnte Tumornekrosen Knoten 4 x 3 cm Ø	keiner	Lunge: 3 mm Ø	22
4. F. H. männl. 64 J.	Multiple nekrotisierende Tumorknoten	diffus	Lunge	6638
5. A. M. männl. 68 J.	Entdifferenziertes, vorwiegend hepatozelluläres Karzinom, massive Tumordinfiltration der gesamten Leber, Knoten bis 9 cm Ø	regional	rechtes Zwerchfell	1600
6. N. W. männl. 62 J.	metastasierendes hepatozelluläres Karzinom, ein Knoten 8x10x10cm	diffus	Lunge	2408

Tab.4: Größe bzw. Tumordinfiltration des PLC und AFP-Serumspiegel .

Bei 3 Patienten dieser Gruppe, bei denen wegen ihrer Leberzirrhose AFP bestimmt wurde, war ihr erhöhter AFP-Serumspiegel der erste Hinweis auf die maligne Erkrankung. Die Serumkonzentrationen bei diesen Hepatompatienten lagen bei 1167, 3097 und 3600 ng/ml, die Diagnose wurde dann histologisch verifiziert.

Insgesamt bestand bei 12 der 18 Patienten in der Vorgeschichte eine sichere Leberzirrhose, während in 3 Fällen auch histologisch kein Anhalt für zirrhotischen Umbau entdeckt werden konnte.

5.4.3 Sekundäre Lebermetastasen

Mäßig erhöhte AFP-Werte fanden wir bei 6 von 15 Patienten mit sekundären Lebermetastasen (Abb.27). Die AFP-Spiegel lagen bei einem Primärtumor des Penis (40 ng/ml), des Magens (22 ng/ml), des Pankreas (23 ng/ml), der Lunge (80 ng/ml) und zwei unbekannten Primärtumoren (111 und 84 ng/ml) in einem Bereich, der bei den entzündlichen Lebererkrankungen (s.u.) ebenfalls nicht überschritten wurde. Bei den Patienten mit AFP-Erhöhung wiesen leicht erhöhte Transaminasen- und LDH-Werte auf eine Leberschädigung hin.

5.4.4 Leberzirrhose

Bei 105 Patienten mit Leberzirrhose wurde das AFP im Serum bestimmt, 3 von ihnen hatten so hohe Werte (s.o.), daß daraufhin die Verdachtsdiagnose primäres Leberzellkarzinom gestellt wurde, die dann bestätigt wurde. Damit ergab sich eine Häufigkeitsrate des Übergangs in ein Hepatom bei Patienten mit Leberzirrhose von 2,9%. Die AFP-Konzentration bei den anderen 102 Fällen reichte bis 134 ng/ml (Abb.29). Eine detaillierte Aufschlüsselung gerade der unteren Bereiche von 0-20 ng/ml ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

AFP-SERUMKONZENTRATIONS-VERTEILUNG BEI PATIENTEN MIT NICHT-MALIGNEN
LEBERERKRANKUNGEN IM VERGLEICH ZUR NORM
(AFP-Konzentration in ng/ml)

Kollektiv	< 5	5 - 10	10- 20	20- 50	50-100	>100	N
Normalpersonen	121 86%	15 11%	4 3%				140
Patienten mit Hepatitis (Einz.)	7 11%	25 40%	11 17%	10 16%	8 13%	2 3%	63
Hepatitis (Verl.)	0	6 20%	5 16%	10 32%	5 16%	5 16%	31
Patienten mit Leberzirrhose	29 28%	32 32%	29 28%	7 7%	4 4%	1 1%	102

Tab.5: AFP-Serumkonzentrationsverteilung bei Patienten mit
Leberzirrhose und Hepatitis im Vergleich zur Norm.

Es fanden sich 87 (90%) AFP-Spiegel unter 20 ng/ml und nur in 13 Fällen bis 134 ng/ml. Die errechnete Häufigkeitsverteilung unterschied sich signifikant von der unseres Normalkollektivs ($p < 0,001$, KOLMOGOROFF-SMIRNOFF-Test).

Für 60 Fälle wurde die Beziehung zwischen Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, Bilirubin- und Transaminasenkonzentration zu AFP-Konzentration untersucht. Dabei fanden sich lediglich signifikant höhere Bilirubinspiegel bei ansteigenden AFP-Konzentrationen ($p < 0,0025$). Der lineare Korrelationskoeffizient zwischen AFP- und Bilirubin-Konzentration war mit 0,433 signifikant von Null unterschieden ($N=60$, $p < 0,001$). Eine Korrelation der anderen untersuchten Parameter zur AFP-Konzentration war bei den Patienten mit Leberzirrhose nicht feststellbar.

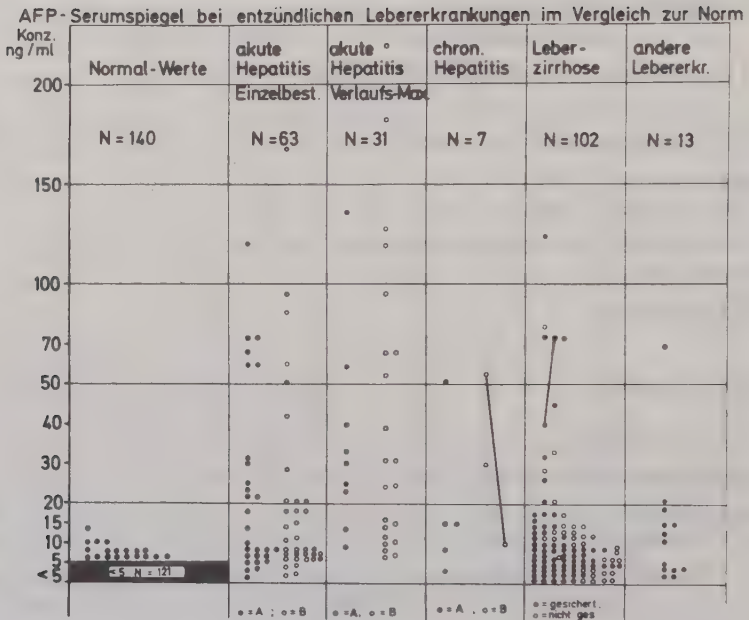


Abb.29

5.4.5 AFP-Spiegelveränderungen bei Hepatitiden

Bei 63 Patienten mit akuter Hepatitis wurde AFP im Anfangsstadium bestimmt, bei 31 auch im Verlauf (Abb.29); davon wiesen bei Patienten mit Einzelbestimmungen 20 von 63 Fällen (=32%) und bei Patienten mit Verlaufskontrollen 20 von 31 Fällen (=65%) Werte über 20 ng/ml auf.

Auch bei den Einzelbestimmungen, die bei den akuten Hepatitis-Fällen alle in den ersten Tagen des Krankenhausaufenthaltes durchgeführt wurden, lagen die Werte unter 20 ng/ml signifikant über der Verteilung des Normalkollektivs (s.auch Tabelle 5).

In diesem Verhalten ergab sich kein Unterschied zwischen Hb - Ag-positiven und -negativen Seren.

Abb. 30 zeigt eine Zusammenstellung der bei 20 Hepatitis-Patienten erhobenen AFP-Spiegel bei Verlaufsbestimmungen. Dabei wurden wegen des ohnehin fragwürdigen Beginns des klinischen Bildes einer Hepatitis die AFP-Maxima der einzelnen Fälle auf einen einzigen Punkt zusammengelegt. Bei den Fällen mit AFP-Anstieg folgte das Maximum in der Regel etwa 5 bis 18 Tage nach maximalem Transaminasenanstieg, im Mittel nach $9,8 \pm 4$ Tagen (V.K. 40,4%, N= 18) und ging mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Cholinesterase-Verminderung einher. Die AFP-Konzentrationen erreichten Werte zwischen 20 und 238 ng/ml und kehrten mit einer Halbwertszeit-Abklingquote zwischen 5 und 20 Tagen zur Norm zurück. Das Verhalten von AFP korrelierte mit einer Vermehrung des Bilirubinspiegels und einer Erniedrigung der Cholesterinesterase bei einigen Fällen, nicht dagegen mit den Transaminasen, der alkalischen Phosphatase, der Albumin- und Gammaglobulin-Konzentration oder der BKS. Die für alle Hepatitis-Patienten geprüfte Beziehung AFP/Bilirubin und AFP/Cholinesterase ergab für den ersten Vergleich einen Gesamtkorrelationskoeffizienten von $r=0,579$ ($p<0,001$) und für den anderen Vergleich einen Wert von $r=-0,569$ ($p<0,001$).

Die Abbildung 31 zeigt das typische Beispiel des Verhaltens verschiedener Serumparameter bei einer akuten Virushepatitis B. Das AFP-Maximum (183 ng/ml) wird 7 Tage nach dem Transaminasen-Gipfel und von einem Abfall der Cholinesterase auf 2,2 mU/ml begleitet. Die Bilirubinkonzentration erreicht ihr

Maximum (14,4 mg%) vor dem AFP-Maximum und fällt parallel zu diesem wieder ab. Den Übergang in eine chronische Verlaufsform gibt Abb. 32 wieder. Die erhöhten AFP-Spiegel (Maximum 55 ng/ml) hielten zusammen mit pathologischen Transaminasen-Werten über 10 Wochen an. Während dieser Zeit blieb die Cholesterinesterase erniedrigt, die Bilirubin-konzentration überstieg nicht den Normbereich.

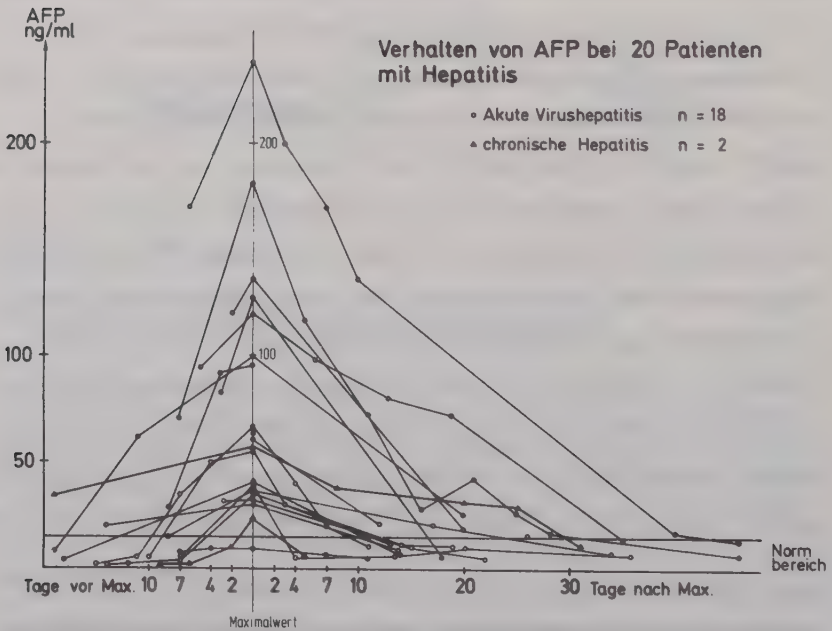


Abb. 30

Verhalten von AFP und Vergleichparametern im Verlauf akuter Virushepatitis (Au-Ag +)

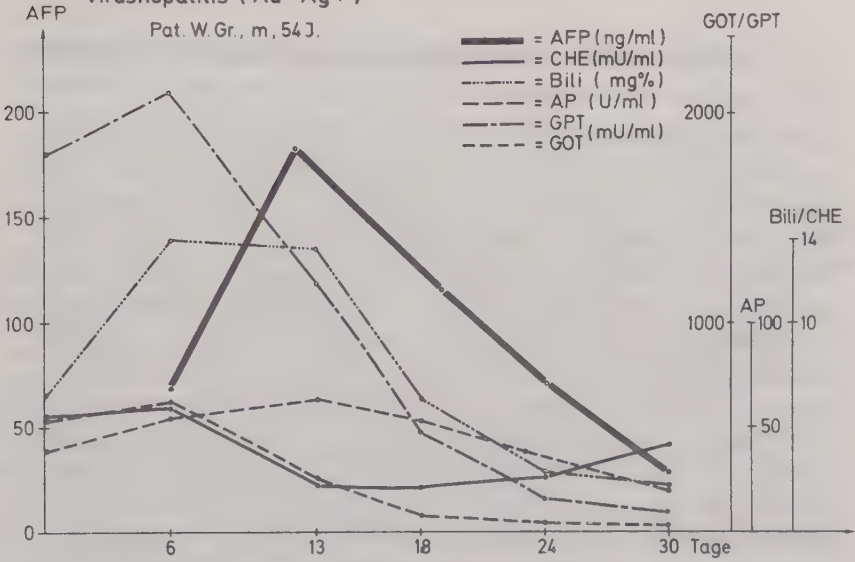


Abb. 31

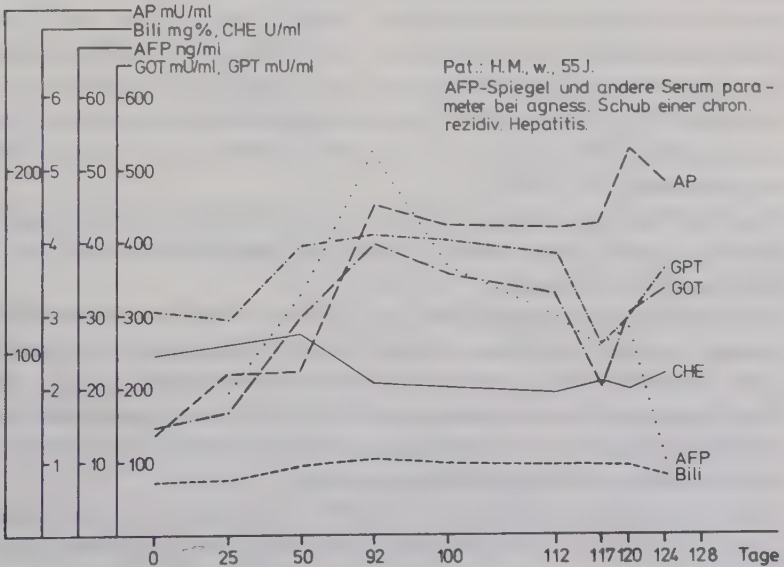


Abb. 32

5.4.6 AFP-Spiegel-Veränderungen nach partieller Hepatektomie

Bei 6 Patienten nach partieller Hepatektomie wegen Echinococcus-Befall der Leber und 2 Fällen nach Laparatomie mit bzw. ohne Leberhilusdarstellung wurden prae- und postoperative Verlaufsbestimmungen durchgeführt (Abb.33). Die ermittelten AFP-Werte gehen aus der Tabelle 6 hervor, in welcher auch Angaben zu den Operationen sowie die ermittelten Halbwertzeiten wiedergegeben sind. Die präoperativen Werte lagen in allen Fällen im Bereich unter 20 ng/ml. Bei den ersten 6 Fällen kam es nach der Operation übereinstimmend schon in den ersten 1-3 Tagen zu einem maximalen AFP-Konzentrationsanstieg zwischen 247 (Nr.6) und 5600 ng/ml (Nr.4). Von diesen Maxima fielen in den folgenden Tagen und Wochen die AFP-Spiegel zunächst stärker und später allmählich in Richtung auf die Norm ab. Eine Konzentrationsrückkehr in den Normbereich konnte im untersuchten Zeitraum nur in 4 Fällen beobachtet werden : nach 35 Tagen (Nr.1), nach 53 Tagen (Nr.2), nach 23 Tagen (Nr.6) und nach 63 Tagen (Nr.8).

Die unkomplizierte Laparatomie (Nr.7) darf wegen gleicher Narkosebelastung als Kontrolle ("Schein-Op") angesehen werden. Bei ihr blieben die AFP-Spiegel vor und nach Operation im Normbereich. Die aus 3-5 Koordinatenpaaren berechneten Regressionsgeraden für Fall Nr.1-5 wiesen Korrelationskoeffizienten r von über 0,97 auf.

Die auf diesen Geraden interpolierten Halbwertzeiten lagen für Fall Nr.2, Nr.3 und Nr.5 um 5,5 Tage und für Fall Nr.1 und Nr.8 bei 8 Tagen.

Der AFP-Anstieg korrelierte mit einem Abfall der Harnsäurekonzentration im Serum, während die Kreatininwerte unverändert blieben. Die niedrigsten Harnsäurekonzentrationen (50% der Ausgangswerte) fanden sich am 5.-8. postoperativen Tag, danach stiegen sie wieder an und erreichten mit Normalisierung der AFP-Konzentration Ausgangswerte.

Abb.34 zeigt das Verhalten von AFP und anderen Serumparametern bei einem 8. Hepatektomiepatienten, bei dem wir noch kürzere postoperative Kontrollwerte 4,8 und 20 Stunden nach

dem Eingriff erhalten konnten. Danach stieg die AFP-Konzentration 20 Stunden p.op. mit 385 ng/ml auf mehr als das 150-fache des Ausgangswertes (2,5 ng/ml) an. Die maximale Konzentration wurde mit 667 ng/ml am 6.postoperativen Tag erreicht. Vergleichend dazu kam es 4 Stunden nach dem Eingriff zu einem leichten Transaminasenanstieg (SGPT 19, SGOT 37 mU/ml) mit Normalisierung am folgenden Tag. Die Cholinesteraseaktivität stieg von einem unteren normalen Grenzwert (3,0 mU/ml) innerhalb des Normbereiches leicht an (4,9 mU/ml), während die alkalische Phosphatase fast gleichzeitig mit dem AFP-Spiegel anstieg und weniger steil zur Norm zurückkehrte. Als in der Leber gebildetes Protein zeigte der Transferrin-Spiegel postoperativ eine Konzentrationsverminderung, die sich erst 3 Wochen später normalisierte. Im Falle der Probelaparatomie kam es zu keiner Änderung dieser Serum-Metabolite.

PRAE- UND POSTOPERATIVE AFP-SERUMSPIEGEL BEI PATIENTEN MIT
 LEBER-ECHINOCOCCUS

Nr., Patient Geschlecht Alter, Nation	Tag/Std. nach OP	AFP-Konz. ng/ml	AFP- Halbwert- Zeit	Diagnose/Bemerkungen
1. Ch. V. weibl. 32 J. Griechin	vor 1 6 18 25 33 63	7 2763 1202 126 39 17 3	8,2 Tage	Unilokuläre Echinococcus-Zyste der Leber; Lobektomie des rech- ten Leberlappens. 15x12x6 cm Resekt.-Präparat 2x 5x6 cm Zyste Hämodilution
2. M. A. weibl. 42 J. Jugoslawin	vor 2 5 12 19 33 53	7 5521 1398 262 134 42 17	5,5 Tage	Leber-Echinococcus, Resektion des halben rechten Leberlappens 18x10x15 cm zyst. Bezirk; Hämodilution
3. C. S. weibl. 41 J. Türkin	vor 2 4 7 14 30	7 2870 1323 584 178 172	5,7 Tage	Leber-Echinococcus, Resektion des linken Leberlappens 13x16x1,5 cm OP-Präparat Hämodilution; anschliessend 500 ml retransfundiert.
4. N. N. männl. 40J. Jugoslawe	vor 3 6 12 16 30	8 5626 2918 570 362 117	8,1 Tage	Leber-Echinococcus cyst. Resektion des linken Leber- lappens: 25x15x0,5 cm OP-Präparat Hämodilution
5. D. K. weibl. 35 J. Jugoslawin	vor 1 4 11	19 3647 1540 270	5,3 Tage	Inoperabler Leber-Echinococcus. Laparotomie; Darstellung des Gefäss-Hilus, Lösung von Ver- wachsungen; Hämodilution.
6. A. H. weibl. 53 J. Deutsche	vor 1 3 7 11 23	9 247 109 34 20 11		Leber-Echinococcus, zwei man- darinengrosse Leberstücke ent- fernt. Keine Hämodilution
7. M. K. weibl. 54 J. Deutsche	vor 1 2 4 6 9 15	5 5 4 5 6 6 7		Inoperabler Leber-Echinococcus Laparotomie, Inspektion ohne Manipulation. Keine Hämodilution
8. N. C. weibl. 22 J. Jugoslawin	vor 4 h 8 h 20 h 2 d 6 9 15 23 65	3 34 231 305 357 637 342 114 26 9		Echinococcus cyst. aus Leber- mittellappen ausgeschält; Re- sektion des linken Leberlappens 12x9x4 cm OP-Präparat Keine Hämodilution

TABELLE 6

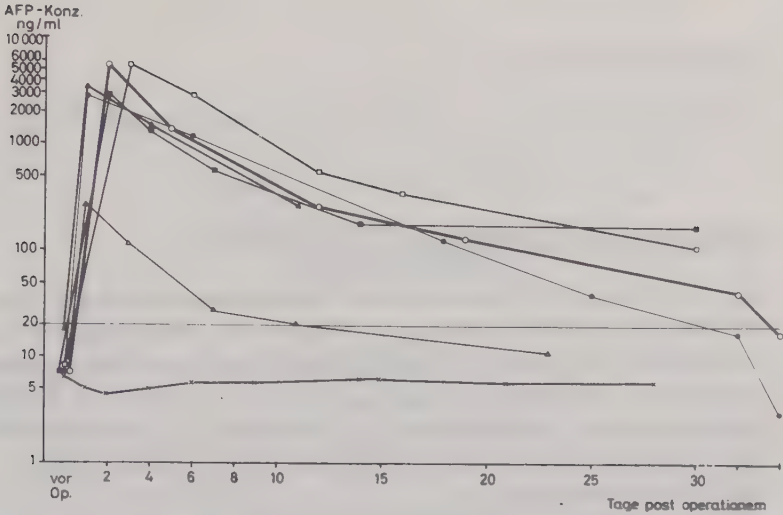


Abb.33: Serum-AFP-Veränderungen nach partieller Hepatektomie

AFP (NORM 0-15)
Transferrin (NORM 200-400)

Serumprotein- und Enzymmuster nach
partieller Hepatektomie

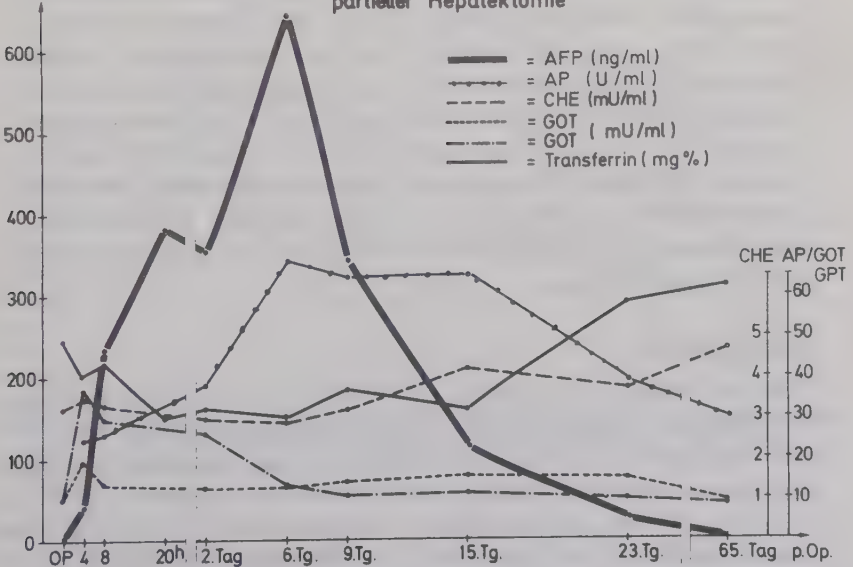


Abb.34

6. DISKUSSION

6.1 DISKUSSION DER METHODISCHEN ERGEBNISSE

Reindarstellung und Eigenschaften des AFP.

Zur Gewinnung von immunologisch reinem Alpha-Fetoprotein benötigten wir drei Schritte, die auf der Abbildung 35 noch einmal im Zusammenhang mit der Entwicklung des Radioimmunoassay dargestellt sind: 1. Voranreicherung von Nabelschnurserum auf der Kartonelektrophorese, 2. Gelfiltration auf Sephadex G-200 und 3. Immunabsorption mittels CNBr.-aktivierte Sepharose 4B.

Eine Übersicht über Ausgangsmaterial, die methodische Reihenfolge und die Effektivität der Isolierungsschritte anderer Autoren gibt die Tabelle 7.

Die Nachteile der Methoden, die zuerst versucht wurden (12, 85, 122, 142) liegen in der Vielzahl und Kompliziertheit und Aufwendigkeit ihrer Schritte. Ohne Immunabsorption mit hochspezifischem Anti-AFP-Serum war eine Reindarstellung nicht (122, 142) oder nur mit der sehr aufwendigen Absorptionsmethode mit mehreren Antiseren gegen die Verunreinigungen (LEHMANN 85) oder durch isoelektrische Focussierung (ALPERT 12) mit sehr geringem quantitativen Effekt möglich. Dagegen basieren die Methoden, mit denen humanes AFP reinst dargestellt oder teilisoliert werden konnte, prinzipiell auf immunpräzipitierenden Präparationen mit oder ohne vorherige Anreicherung.

Anreicherung

Einige Autoren bevorzugten zur Voranreicherung der Substanz Fällungsmethoden (8, 85, 122, 142) mit Ammoniumsulfat oder oder Euglobulin oder durch Hitze, die jedoch mit hohen Verlusten behaftet waren. Vergleichbar mit unserer Anreicherung ist die Stärkeblockelektrophorese (45 x 45 x 1,5 cm aufgetragen 7,5 ml PLC-Serum) von ALPERT und Mitarb. (12), der so ebenfalls die α_1 -elektrophoretische Beweglichkeit

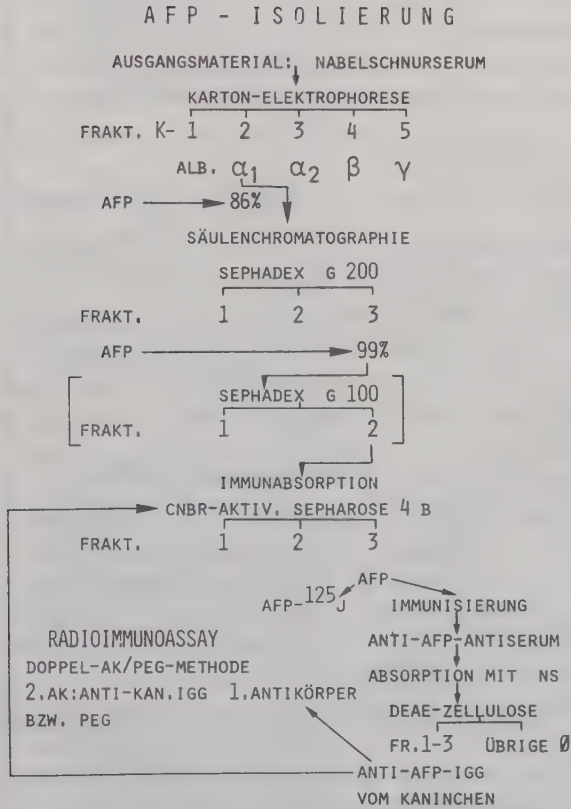


Abb.35: Schema des methodischen Arbeitsweges zur Gewinnung der Arbeitssubstanzen Antigen und Antikörper für einen AFP-Radioimmunoassay

ZUSAMMENSTELLUNG VON METHODEN VERSCHIEDENER AUTOREN
ZUR AFP-GEWINNUNG

Autor, Jahr (Ref.)	Ausgangs- Substanz	Methodische Schritte	Ertrag	Reinheits- Prüfung
NISHI 1970 (179)	Fetalser. (Pool) 1 PLC-Ser.	1. Spezif. Antiserum v. Kaninchen 2. Immunpräzipitat mit Poolserum Reinigung d. Ag/Ak-Komplexes 3. Immunisierung mit Ag/Ak-Komplex Spezif. Antiserum vom Pferd 4. Immunpräzipitat mit Poolserum Auflösung und Reinigung durch Waschzyklen mit Glycin-HCl und Na ₂ HPO ₄ 5. Gelfiltration	ca. 70%	Immun-El. rein Ultrasch. homogen
RAPP & LEHMANN 1970 (142)	5 Liter Tumor- Ascites	Euglobulin-Fällung Ammoniumsulfat-Fällung (60%) DEAE-Ionenaustauscher-Chromatogr. Ammoniumsulfat-Gradient Gelfiltration mit Sephadex G 100	?	nicht rein Verunr. Albumin Alpha- Antityps
ADINOLFI et al. 1971 (8)	Nabel- schnur- Poolser. 1 PLC-Ser.	Ammoniumsulfat-Fällung (40-65%) des Poolserums; monospezif. Antiserum Immunpräzipitation, Ammoniumsulfat- Fällung des Ag/Ak-Komplexes, Gel- filtration, Lösung des Immunkom- plexes in 4 M NaJ pH 9	?	Immun-El. nicht rein: Spur Albumin
RUOSLAHTI und SEPPÄLÄ 1971 (147)	Fetal-Ser.	Elektrofokussierung Immchem. Reinigung mit Anti-AFP- IgG vom Schaf Gelfiltration mit Sephadex G 200	ca. 20%	Polyacryl- amid-El./ Ouchterl.: rein
LEHMANN et al. 1971 (85)	PLC- Tu- Gewebe PLC- Plasma	(Hitze-fällung), Calciumphos- phatgel-Absorption, fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung, DEAE-An- ionenaustauscher-Chromatographie, Gelfiltration, 1. und 2. Immun- absorption mit verschiedenen Antis.	8,8%	Immun-El. Ouchterl.: rein gegen 25 von 24 Antiseren
NORGAARD-PEDERS 1971 (122)	Nabel- schnur- Poolser. Austausch Blut	Ammoniumsulfat-Fällung (2,17 M/l) Ionenaustauscher-Chromatographie QAE Sephadex A 50	?	?
ALPERT et al. 1972 (72)	PLC-Ser.	Präparative Stärkeblock-Elektrophor. Gelfiltration mit Sephadex G 75, präp. isoelekt. Fokussierung	niedrig	Ouchterl.: rein
NISHI u. HIRAI 1972 (177)	PLC-Ser.	Affinitäts-Chromatographie mit CNBr-aktiv. Sepharose 6 B, Gelfiltration	85%	Immun-El. rein
CARON et al. 1973 (28)	Ascites (1,2 l)	Affinitäts-Chromatographie mit sub- stituierter (Phloroglucinol-hydroxy- propyl-Agarose) CNBr-aktivierter Sephadex 4 B	70%	Immun-El. Ouchterl.: rein
Eig. Unters. 1975	Nabel- schnur- Poolser. PLC-Ser.	Präparative Karten-Elektrophorese Gelfiltration mit Sephadex G 200 Affinitäts-Chromatographie auf CNBr-aktiv. Sepharose 4 B	30%	Immun-El. Ouchterl.: rein

TABELLE 7

des AFP ausnutzte. Wie wir fand er das AFP in der Albumin-Fraktion und der nachfolgenden Fraktion, machte jedoch keine weiteren qualitativen Angaben zu den Ergebnissen dieses Reinigungsschrittes.

Das von uns verwandte Verfahren der Kartonelektrophorese zeichnet sich gegenüber den oben genannten durch eine hohe Effektivität und Einfachheit bei niedrigen Kosten aus, zumal es an unser Labor adaptiert war.

Gelfiltration

Wie auch bei anderen Autoren (12, 85, 142) wurde von uns die Gelfiltration als Reinigungsmethode herangezogen. ALPERT, (12) benutzte Sephadex G-75, das er für vorteilhafter hält als das von uns wegen unserer großmolekularen Verunreinigung bevorzugte. Er eluierte mit Phosphat gepufferter NaCl-Lösung und erhielt 2, gelegentlich auch nur einen Peak, das AFP befand sich im ersten Fall immer im letzten Peak (wie auch bei unseren Untersuchungen). Daß ALPERT maximal 2, wir jedoch regelmäßig 3 Peaks bei diesem Verfahren beobachteten, mag an der Selektivität von dessen erstem Schritt (Stärkeblockelektrophorese) liegen: Bei einer Wanderungsstrecke von 27 cm schnitt er nur 1 cm breite Streifen aus, während wir aus Interesse an einer hohen Wiederfindungsrate bei einer Wanderungsstrecke von 14 cm 1,5 cm breite Streifen abtrennten und somit größere Verunreinigungen in Kauf nahmen.

Die Gelfiltration der Proteinlösung in Sephadex G-120 von LEHMANN (85) zeigt das AFP ebenfalls im letzten von zwei, bei RAPP (142) im letzten von drei Peaks, in denen wie bei uns ebenfalls noch Albumin und Alpha₁-Antitrypsin nachgewiesen wurden. Die Gelfiltration der übrigen Autoren bezieht sich auf AG/AK - Präzipitastrennung mit saurem Puffer, auch sie stimmen in der Wiederfindung des AFP im jeweils letzten Peak überein.

Immunabsorption

Da mit den beiden oben genannten Verfahren allein die notwendige Reinheit der Substanz nicht zu erreichen war,

schlossen wir die Affinitätschromatographie, bei der spezifisches Anti-AFP-IgG an CNBr. aktivierte Sepharose gebunden wird, an. Diese Methode wird nur von zwei Autoren, NISHI (117) und CARON (28) in diesem Zusammenhang beschrieben. NISHI benutzte Sepharose 6 B, die er selbst mit CNBr aktivierte, und konnte, da ihm eine große Quantität Pferdeantiserum zur Verfügung stand, 200 ml Gel mit 10 g IgG koppeln. Das ist etwa das 15-fache der IgG-Menge, die wir an die Sepharose gebunden haben (100 mg auf 30 ml Gel). Im Gegensatz zu unseren Vorreinigungsschritten gab NISHI unbehandeltes PLC-Serum auf die Säule, eluierte wie wir mit 0,1 M Glycin-Puffer pH 2,8, neutralisierte ebenfalls sofort das Eluat. Nach seinen Angaben wäre das Lösen des Antigens vom Antikörper der Säule auch mit 2 M Na-Jodid (pH 7) möglich, doch mit einer niedrigeren Wiederfindungsrate. Außerdem muß man in diesem Fall auf eine Extinktionsmessung verzichten, da NaJ UV-Licht absorbiert. Die Wiedergewinnungsrate lag bei 80%.

CARON (28) beschreibt eine interessante Variante dieser Methode, mit welcher er in einem einzigen Schritt AFP nicht ganz so ergiebig (70% statt ca. 80%), aber immunologisch rein gewonnen hat. CARON substituierte Sepharose 4 B mit Phloroglucino-hydroxypropyl-Agarose, welche daraufhin erst mit CNBr aktiviert wurde. 30 ml Gel koppelte er mit 44 mg IgG, also etwa nur der Hälfte der von uns genommenen Menge. Das so präparierte Gel wurde schubweise mit AFP-haltigem Tumor-Aszites vermischt, inkubiert und dekantiert, dann erst auf eine Säule gegossen und mit 0,1 M Glycin-Puffer pH 3,0 das Protein vom Antikörper getrennt. Während ein analoges Verfahren mit unsubstituierter CNBr aktivierter Sepharose 4 B α -Fetoprotein-Fractionen mit Verunreinigungen erbrachte, gewann CARON mit dem oben beschriebenen Verfahren eine Fraktion mit reinem AFP (Anfang und Spitze des Elutionspeaks) und eine mit Verunreinigungen (absteigender Teil des Peaks). Diesen Vorteil der Immunadsorption auf substituiertem Sepharose erklärt der Autor mit einer Erhöhung der Anzahl von reaktivierbaren Hydroxygruppen und Vergrößerung des Abstands des Liganden von der Sepharose-Matrix.

Vergleichbar ist die Wiedergewinnungsrate, welche bei CARON 70%, bei NISHI 85% und bei uns bis zu 74,3% betrug. Die Beobachtung CARONS, daß die zweite Fraktion des Elutionspeaks mit saurem Puffer noch Verunreinigungen beinhaltete, während die erste nur reine Substanz enthielt, machten wir gleichfalls und zwar bei einer Säule, bei der ein Antiserum verwandt worden war, das in der zweidimensionalen Doppeldiffusion noch Spuren von anderen IgG-Komponenten gezeigt hatte. In den Fraktionen, die Anstieg und Gipfel des Peaks entsprachen, fanden wir nur AFP, welches wohl dem gekoppelten Antiserum in solchem Überschuß angeboten worden war, daß es zuerst wieder getrennt wurde. Was die quantitative Bilanz unseres gesamten Isolierungsverfahrens angeht, so liegt es mit 30% zwar nicht so gut wie die von NISHI (116,117) und CARON (28), die 70% und mehr erreichten, aber doch höher als RUOSLAHTI (147) mit 20% und LEHMANN (85) mit 8,8 - der allerdings aus Tumorextrakt isolierte und immerhin 57,1 mg AFP kristallisiert und 99%ig rein erhielt.

Zusammenfassend scheint uns das von uns verwandte Verfahren sowohl im Hinblick auf den erforderlichen Bedarf an reinem AFP (Antiserumherstellung, Markierung) als auch mit Rücksicht auf die relativ geringen Mengen Nabelschnurserum, die wir kurzfristig zur Poolherstellung erhalten konnten, besonders praktikabel, weil es einen vertretbaren technischen Arbeits- und Zeitaufwand erfordert und das Isolierungsverfahren sich nach dem ersten Trenn- und Immunisierungszyklus durch den gewonnenen Anti-AFP-Antikörper selbst unterhält.

Reinheitsprüfung

Die Reinheitsprüfung der isolierten Substanz erfolgt bei allen Untersuchern grundsätzlich auf immunologischer Basis. Neben der immunelektrophoretischen Prüfung gegen Anti-Humanserum kommt der Doppelgel-Diffusion nach OUCHTERLONY dabei die größere Be-

deutung wegen ihrer höheren Empfindlichkeit zu. Das Fehlen jeglicher Präzipitationsreaktion zwischen Prüfsubstanz und Anti-Normalserum, Albumin und anderen Proteinen gilt als Haupt-Reinheitskriterium für uns und andere Autoren (28, 84, 294, 350).

Als weiteres wichtiges Reinheitszeichen gilt ein homogenes Verhalten des Proteins im elektrischen Feld bei Verwendung einer hochempfindlichen analytischen Trennmethode wie z.B. der Polyacrylamid-Elektrophorese. Die von anderen Autoren bei solchen Untersuchungen gereinigter AFP-Präparationen gefundene immunologische Heterogenität bei immunologischer Reinheit wurde als Variante bzw. Dimer- und Oligomer-Bildung interpretiert. So fand ALPERT (12) durch Isoelektrofokussierung zwei immunologisch identische, nur durch ihren isoelektrischen Punkt (4,85;5,2) abweichende Formen mit gleichem Molekulargewicht. RUOSLAHTI und Mitarb. (147) führten wie wir eine Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit ihrer immunologisch reinen Substanz durch und fanden ebenso neben einer sehr starken Bande eine schwächere, langsam wandernde, deren MG 140000 betrug. Sie deuteten diese als Dimer-Form, die möglicherweise artifiziell z.B. durch Einfrieren und Wiederauftauen entstanden sein sollte. Diese Interpretation könnte auch für das von uns beobachtete Phänomen zutreffen, da unsere Substanz ebenfalls vor der Untersuchung bei -70°C gelagert war.

Molekulargewicht

Das Molekulargewicht von dem bei uns isolierten α -Fetoprotein wurde mittels Platten-Polyacryl-Elektrophorese mit $67\ 000 \pm 2000$ ermittelt. Dieser Wert liegt etwas niedriger als das Ergebnis von ALPERT und Mitarb. (12) und RUOSLAHTI (147) mit 72 000 bzw. 70 000 mittels SDS-Acrylamidgel-Elektrophorese. Deutlicher weichen die Ergebnisse von MASO-PUST et al. (99) : 76 000, von ADINOLFI et al. (8) : 61 000 (PLC-Serum), 63 000 (Nabelschnurserum), und von NISHI (116) : 64 000 ab, die alle auf Gel-Filtrationsverfahren beruhen.

Für die unterschiedlichen Angaben dürften vor allem methodische Unterschiede verantwortlich sein. So diskutiert z.B. RUOSLAHTI Tertiär-Struktur-Änderungen oder Hydrolyse des AFP-Moleküls durch den stark sauren Puffer bei der von ihm verwandten Gelfiltrationsmethode.

Antiserum

Während von den ersten Untersuchern zur Herstellung von Antiserum gegen α -Fetoprotein ungereinigte, meist fetale Serumpräparationen verwandt wurden (8,116,122), benutzen wir wie andere Autoren (12,117,119,142) gereinigte Substanzen. Die von uns injizierte Antigen-Menge von ca. 1,5 mg AFP pro Kaninchen entspricht in etwa der von NISHI (119) für ein Tier genommenen Substanzmenge. Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Gewinnung von Anti-AFP-Serum unterscheiden sich im Detail alle von einander, der Immunisierungszeitraum beträgt meistens 2-3 Monate; die von uns praktizierte Nachboosterung mit einer K Al-Suspension wird von keinem anderen Autor angegeben. Sie erwies sich jedoch wegen der Kürze der Immunisierungsdauer von 4 Wochen bei sehr befriedigender Effektivität als besonders vorteilhaft.

Die Absorption des Antiserums mit normalem Erwachsenenserum wurde von allen Untersuchern durchgeführt, jedoch mit stark differierenden Volumenverhältnissen : 1:0,35 (119), 1:3 (116), 1:30 (122) ml Antiserum gegen ml Normalserum. Da wir ca. 40 ml Kaninchenserum mit 250 mg lyophilisiertem Normalserum absorbierten, entspricht dies einem Verhältnis 1:0,1.

Unserer Erfahrung nach reichte diese Menge völlig aus, da das nicht absorbierte Antiserum keine oder nur spurenhafte Antikörperreaktionen gegen normales Serum zeigte. Die somit geringe notwendige Menge an Absorbierungsmaterial stellt sich als weiterer Vorteil unserer Immunisierungsmethode dar.

Die Abtrennung der γ -Globuline wurde wie von uns auch von NISHI (118) mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie an

der DEAE-Zellulose durchgeführt. Übereinstimmend mit diesem Untersucher beobachteten wir, daß die IgG-Fraktion gegenüber dem unbehandelten Antiserum eine 5-fach stärkere Antikörperpotenz aufweist. Andere Autoren reicherten ihr Antiserum mittels Gelfiltration an (8,117). Die Gewinnung einer konzentrierten reinen IgG-Lösung ermöglicht genaue Standardisierung des nun titerkonstanten Antisera, was für die Verwendung im Radioimmunoassay sehr vorteilhaft ist.

Wie NISHI (117) verglichen auch wir die spezifischen Antikörpertiter unserer Antisera mit einem kommerziellen Referenz-Antiserum (Fa. BEHRINGWERKE) mit Hilfe der umgekehrten einfachen radialen Immundiffusionsmethode, bei der der Antikörper in eine Antigen-haltige Agarschicht diffundiert. NISHI untersuchte mit dieser Methode Anti-AFP-Seren verschiedener Spezies und ermittelte Kaninchen und Pferde als beste Anti-Human-AFP-Antikörperbildner.

Markierung

Übereinstimmend mit anderen Autoren richteten wir uns bei der radioaktiven Markierung des α -Fetoproteins nach dem von HUNTER (56) beschriebenen Verfahren. Der Einbau des Isotops (am besten hat sich NaJ^{125} bewährt) erfolgt dabei unter Zuhilfenahme des Chloramin T, eines schwach oxydierenden Agens. Dieses induziert - wahrscheinlich über eine von ihm oxydierte Form des Jods - eine quantitative Substitution an ionisierte Tyrosin-Gruppen des Proteins. Diese Reaktion hat ihr pH-Optimum bei 7,5. Die Effektivität der Markierung hängt unter anderem ab von der Proteinkonzentration. Sie beträgt nach HUNTER für Proteine mit mäßigem Tyrosinanteil 300 $\mu\text{g/ml}$. RUOSLAHTI bestimmte diesen für AFP mit 17,9 Mole auf 70 000 Gramm des Proteins. Wir verwendeten deshalb für unsere Markierung eine 250 $\mu\text{g/ml}$ AFP-konzentrierte Lösung. Da eine Beschädigung des Proteins durch Chloramin T möglich ist, wurde die suboptimale Menge dieser Substanz genommen: 10 μg pro μg Protein.

Bekanntlich kann die Immunreaktionsfähigkeit des Proteins bei dem Markierungsvorgang beeinträchtigt werden. Da wir bei unserer

markierten Substanz die verhältnismäßig geringe Bindungskapazität von 55% beobachteten, seien die möglichen, von HUNTER hierfür genannten Gründe kurz genannt: Veränderung der Proteinstruktur durch die Jod-Substitution, radioaktive Strahlenschäden, chemische Beschädigungen durch zu hohe Konzentrationen der Reagenzien oder durch zufällig in der Markierungslösung sich befindende Noxen. Einige dieser Fehlerquellen können durch Verminderung der angebotenen Aktivität und Verkürzung der Reaktionszeit ausgeschaltet werden. Wir haben deshalb nach anfänglichen Versuchen mit 1 mCi auf 5 µg AFP 60 sec., bei denen wir ein kaum meßbares Bindungsergebnis erhielten, das radioaktive NaJ¹²⁵ auf 0,2 mCi und die Reaktionszeit auf 25 Sekunden gesenkt. In der Literatur bezüglich des Verhältnisses der angebotenen Aktivität zur Proteinmenge erhebliche quantitative Unterschiede des prinzipiell gleichen Verfahrens (s.dazu Tabelle Nr.8). RUOSLAHTI (149) verwendete die 5-fache, MASEYEFF (103) die 3-fache, HIRAI die 1/2-fache (52) und PURVES (139) etwa die gleiche radioaktive Substanz wie wir. Die spezifische Aktivität liegt bei HIRAI (16,6 µCi/µg) und bei uns (20,6 µCi/µg) deutlich niedriger als bei anderen Autoren (31, 103).

Die Reinigung des Markierungsgemisches erfolgte bei uns durch Gelfiltration. Während alle Autoren ebenfalls als ersten Schritt zur Abtrennung von gebundener und ungebundener Radioaktivität die Gelfiltration durchführten, schlossen einige (52, 103, 149) dem entweder keinen oder einen elektrophoretischen entsprechenden Reinigungsschritt an (31, 139). Die Verwendung der alleinigen Reinigung ohne Rechromatographie an Sephadex G-100 hat den Nachteil, daß die Selektion der am besten immunreagierenden Fraktion nicht möglich ist.

Die von uns erhaltene relative Radioaktivitätsverteilung im Chromatogramm des ersten Reinigungsschrittes für den Protein-Peak stimmt mit den entsprechenden Angaben von RUOSLAHTI (149) von 31,5 bzw. 51,8 % gut überein. Allerdings verwendeten wir vom zweiten Chromatogramm (Sephadex G-100) die

höchsten Fraktionen des aufsteigenden Schenkels mit dem Maximum, RUOSLAHTI ausschließlich die Fraktion mit der höchsten Zählrate. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von MASSEYEFF (103) fanden wir, daß die Fraktionen des absteigenden Schenkels der G-100-Säule wahrscheinlich wegen Schädigung nicht brauchbar waren. Für sie ermittelte MASSEYEFF eine reduzierte elektrophoretische Mobilität. Aus diesem Grunde benutzte er nur die Fraktionen des aufsteigenden Schenkels. Diese Fraktionen ergaben auch bei uns stets die höchste Bindungsrate.

Unmittelbar nach Ermittlung der geeigneten Verdünnung des radioaktiven Antigenmaterials für den Radioimmunoassay wurde die gesamte Lösung des markierten AFP auf die entsprechende Arbeitsverdünnung aufgefüllt und für längere Lagerung in geeigneten Portionen bei -70°C aufbewahrt. Die dadurch erstrebte Verminderung der Strahlenschäden des Proteins auf ein Minimum empfehlen auch einige andere Autoren.

ZUSAMMENSTELLUNG DER ANGABEN VERSCHIEDENER AUTOREN ZUM
AFP-RADIOIMMUNOASSAY

Autor, Jahr (Ref.)	Radioakt. Protein mCi; μ g	Spez. Akt. μ Ci/ μ g Reakt.- Zeit (Sek.) (μ Ci/ μ g x Min.)	1. Antik. Spezies Verd.	2. Antik. Spezies Verd.	TK	BK	RIA-Konz. Bereich ng/ml	Puffer ² Zusatz
RUOSLAHTI und SEPPÄLÄ 1971 (144)	1,0 mCi 5,0 μ g		Schaf 1:120000	Kaninchen 1:4	76%	13%	0,25 - 10	0,125% BSA NHS
PURVES & PURVES 1972 (139)	1,25 mCi 25,0 μ g	60 Sek. (50)	Kaninchen 1:5000	Schaf	80%	50%	20-1000	0,2% BSA 0,1 M EDTA
HIRAI et al. 1973 (52)	1,4 mCi 73,1 μ g	16,6 30 Sek. (9,6)	Kaninchen 1:30000	Schaf 1:10		40%	2 - 500	1% HSA
CHAYVIALLE et al. 1973 (30)			Schaf 1:12000	Kaninchen 1:200	80%	40%	0,15-3,2	1% HSA
CHAYVIALLE et al. 1974 (37)		60-80	Kaninchen 1:60000	Esel 1:120	85%	25%	0,5-6,9	1% Pferd serum
MASSEYEFF et al. 1974 (103)	1,5 mCi 14,0 μ g	ca. 100 45 Sek. (80,3)	Kaninchen 1:40000	Schaf 1:10	65%	20%	0,1-70	
WALDMANN und McINTIRE 1974 (186)			Kaninchen 1:2000	Ziege		50%	5 - ?	1% BSA
JONSSON und KRONVALL 1974 (60)			Kaninchen 1:20000			30%	2,5-320	0,1% HSA 0,1 M EDTA
Eig. Unters. 1975	0,2 mCi 5,0 μ g	ca. 20 25 Sek. (16,7)	Kaninchen 1:120000	Ziege 1:15- 1:20 Esel 1:20	55%	20% - 30%	2,5-320	1% BSA 0,1 M EDTA

1: Markierung nach der Chloramin T-Methode (HUNTER); 2: Als Grundpuffer Veronal-P. od.
0,03 M Phosphatpuffer; 3: Feste-Phasen-Test mit Staph. aureus als IgG-Präzipitant
TK= Totalkapazität (B/T); BK= Bindungskapazität (B/B); NHS= Normal-Humanserum
BSA= bovines Serum-Albumin; HSA= humanes Serum-Albumin.

TABELLE 9

Radioimmunoassay

Für die Herstellung eines Radioimmunoassays wurden verschiedene Methoden entwickelt. Die Doppelantikörpermethode stellt das verbreitetste und auch von uns angewandte Verfahren dar. Es hat den Vorteil, daß die Immunpräzipitation des ersten Antigen/Antikörperkomplexes durch das IgG einer zweiten Spezies sehr genau reproduzierbar ist, und durch einen einfachen Testansatz die nötige IgG-Konzentration für alle weiteren Versuche festgestellt werden kann(56). Wegen des nicht geringen Kostenaufwandes bei verhältnismäßig hohem Mengenverbrauch wurden jedoch weitere Präzipitationsverfahren entwickelt, die das IgG des ersten Antikörpers an eine feste Phase (Sepharose, Sephadex, Cyano Bromid u.a.) kovalent binden.

HUNTER empfiehlt als zweiten Antikörper Esel-IgG in zu testenden Endverdünnungen zwischen 1:60 und 1:240. Bei uns bewährten sich Ziegen- und Esel-Antiseren in Endkonzentrationen von 1:120. Zum Aufbau eines Präzipitationsnetzes zwischen erstem Antigen/Antikörperkomplex und zweitem Antikörper muß wegen der geringen Antikörperkonzentration unbedingt Normalse- rum der Spezies zugefügt werden, von der das erste Antiserum stammt. Dessen Konzentration darf jedoch nicht zu hoch sein, (56); wir gaben es in einer Endkonzentration von 1:2160 zum Ansatz, HUNTER hält eine Verdünnung 1:2400 für ausreichend. Auf Tabelle Nr.9 sind einige Merkmale der bisher veröffentlichten Radioimmunoassays (RIA) zusammengestellt.

Die Grundlage für den Riapuffer bildet üblicherweise Phosphatpuffer und NaCl oder 0,07 M Veronalpuffer (97). Wir verwendeten 0,01 M Phosphatpuffer, den wir auf einen pH-Wert von 8,6 einstellten. In diesem pH-Bereich arbeiten auch andere Autoren (97,139), während einige (31,149) analog dem von HUNTER beschriebenen Beispiel einen neutralen pH von 7,5 bevorzugen.

Unterschiedlich wird von den verschiedenen Autoren die Zugabe des Albumins gehandhabt. HUNTER und andere (s.Tab.) schlagen Pferdeserum in 0,1 bis 1%iger Konzentration vor. RUOSLAHTI (149) fand bei einigen Rinderserum-Präparationen

Inhibitionsreaktionen des Radioimmunoassaysystems und benutzt deshalb humanes Normalserum, das von AFP gereinigt wurde.

Der Gebrauch von EDTA hat nur Sinn, wenn es mit dem zweiten Antikörper zusammen dem Inkubationsgemisch hinzugefügt wird. In diesem Fall soll es die Complementfaktoren im Analysenserum hindern, die Immunpräzipitationen des zweiten Antikörpers mit dem Antigen/Antikörper-Komplex zu stören. Befindet es sich von Anfang an im Reaktionsgemisch, muß man mit einer Behinderung der ersten Immunkomplexbildung rechnen (56). Vielleicht ist dies der Grund, daß sich außer uns nur noch zwei weitere Autoren (60,139) dieser Modifikation bedient haben; CHAYVIALLE (31) dagegen erhitzt zum Zweck der Complementinaktivierung die Seren 30 min auf 56°C vor der radioimmunologischen AFP-Bestimmung.

Den spezifischen Antikörper erhielten die meisten Autoren wie wir ebenfalls durch Immunisieren von Kaninchen, nur zwei Untersucher (30, 149) benutzten Schaf-Immunglobulin-G. Die Verdünnungsgrade des Antikörpers reichen bei den Antikörperverdünnungskurven fast aller Autoren bis in den Bereich von 1:1000 000. Daß wir jedoch noch Bindungsaktivität bei einer Verdünnung von 1:5 600 000 feststellen konnten, mag vor allem an der chromatographischen Anreicherung unseres Serums liegen. Wir fanden in verschiedenen Testansätzen mit AFP-Standardreihen die Verdünnung 1: 120 000 als die geeignetste. Diese Konzentration ließ noch eine Bindung von 25-30% der Totalaktivität zu, was etwa der Hälfte der maximal möglichen Bindungskapazität entspricht. Die meisten Veröffentlichungen geben ein ähnliches Verhältnis von maximaler und im Radioimmunoassay benutzter Bindung an (30,52,60,139,186). Andere Autoren verwenden jedoch Antikörperverdünnungen, welche nur 25-30% des maximal möglichen markierten AFP binden.

Daß unsere höchste Bindungsrate $^{125}\text{AFP}/\text{l. Antikörper}$ nicht über 55% hinaus kam, wurde oben schon erwähnt und diskutiert. HUNTER fordert ein Erreichen von mindestens 80%, sonst sei

die Substanz beschädigt oder verunreinigt. Für den letzteren Fall haben wir keine Anhaltspunkte. Die Bindungsrate von 25-30% in unserem Assay läßt sich dagegen mit den anderen gut vergleichen, nur PURVES (336) und WALDMANN (186) benutzten eine deutlich höhere ^{125}AFP -bindende Antikörperkonzentration (vgl. dazu Tabelle Nr.9).

Standardverdrängungskurve

Vorraussetzung für eine brauchbare Standardkurve ist nach HUNTER (56) die gleichmäßige Abnahme der Bindung des markierten Antigens bei Verdoppelungen der zugefügten konkurrierenden freien Antigenmengen. Ausgehend von einer gleichen Konzentration des radioaktiven und freien Antigens fand er experimentell einen idealen Prozentabfall von 11,4% pro Verdünnungsschritt. Erhält man eine so verlaufende Kurve, kann man davon ausgehen, daß freies und markiertes Protein eine sich kaum unterscheidende Affinität zum ersten Antikörper besitzen, und daß die gewählte Antikörperkonzentration optimal ist. Bei logarithmischer Transformation der Standardkurve sollte diese in eine Gerade übergehen. Limitiert wird die quantitative Brauchbarkeit einer Standardkurve von einem genügend großen Abstand des Kurvenbeginns von der Nullwertbindung (ca. 10%); wir erreichten $8,7 \pm 2,5\%$ in 10 verschiedenen Testansätzen mit einer durchaus noch praktikablen Ablesbarkeit des unteren Konzentrationsbereiches. Die Standardverdrängungskurve, die wir mit unseren eigenen Substanzen erhielten, nähern sich HUNTER's Forderungen in folgenden Punkten an: einen linearen Verlauf nimmt die Gerade zwischen 5 Standard-Konzentrationen (entsprechen 10-160 ng/ml) an, hier beträgt ihr Abstand zwischen 12 und 20% der Nullwertbindung; HUNTER hingegen ging von der prozentualen Minderung der Totalbindung aus, sodaß nur die Gleichmäßigkeit der Schritte vergleichbar ist, die wir nicht in so hohem Maße erreichen konnten. Obwohl wir die eingesetzten Anfangsmengen von markiertem und freiem α -Fetoprotein mit 0,5 ng (5 ng/ml) Standard-AFP und 0,3-0,5 ng ^{125}AFP gleichsetzten

muß die Diskrepanz zu dem geforderten Kurvenverlauf in einem unterschiedlichen antigenetischen Verhalten beider Proteine zum ersten Antikörper liegen. Ein Vergleich mit den in der Literatur bisher veröffentlichten Standardverdrängungskurven zeigt jedoch, daß auch diese sämtlichst einen mehr oder weniger abgeflachten s-förmigen Verlauf in einem Koordinatensystem mit logarithmischem Konzentrationsmaßstab aufweisen. Einen linearen Verlauf weisen alle Standardkurven ebenfalls nur zwischen 4 und 5 Konzentrationsschritten auf. Die Ordinate wird entweder mit der Zählrate pro Minute oder der prozentualen Totalbindungsrate bezeichnet. Das von uns bevorzugte System mit den Prozenteinheiten der Aktivitätsbindung des Nullwertes - numerisch oder in logits ausgedrückt - findet sich in keiner dieser Arbeiten. Wie oben ber ichtet, ermöglicht dieses Auswerteverfahren durch Konstruktion einer linearen Regressionsgeraden eine gute Möglichkeit an Hand deren Parameter A (Ordinatenabschnitt) und B (Steigung) die einzelnen Testansätze untereinander zu vergleichen. Die höchste Empfindlichkeit unseres Testes lag bei 2,5 ng/ml. Die Versuche, unter Verwendung wesentlich geringerer Quantitäten von radioaktivem AFP die Sensibilität zu steigern, gelang nicht. Die von HUNTER vorgeschlagene Modifikation zu diesem Zweck die markierte Substanz erst nach Vorinkubation des freien Proteins mit dem ersten Antikörper zuzugeben, brachte bei uns keine Veränderung des Ergebnisses, sodaß wir annahmen, daß mit der angegebenen untersten Standarkonzentration die Grenzen unseres radioimmunologischen Systems erreicht waren. Einen vergleichbaren Meßbereich beschreiben 5 Autoren (28, 52,60,139,186), dagegen geben ebensoviele eine 10 bis 20 mal niedrigere Empfindlichkeit an (30,31,59,103,149). Wir haben aus praktischen Gründen auf eine quantitative Verfeinerung unserer Methode verzichtet, da wir mit dem Bereich von 5-320 ng/ml sowohl normale als vor allem schon pathologisch erhöhte AFP-Serumkonzentrationen erfassen können.

Kreuzreaktionen

Jedes RIA-System birgt in sich die Gefahr, daß Störeinflüsse nicht immunologischer Art (z.B. Serumfaktoren) oder immunologischer Art (z.B. kreuzreagierende Antigene) zu einer stärkeren Verdrängung des markierten Tracers vom ersten Antikörper führen, die man fälschlicherweise als spezifische Verdrängung, d.h. in der Probe als erhöhte Antigenkonzentration gewertet wird. So beschrieb HIRAI (52) eine geringe verdrängende Wirkung von AFP-freiem menschlichem Serum, Ratten- und Pferdeserum. Einen ersten Hinweis auf eine nur sehr geringe Wirkung solcher Störfaktoren auf unseren Assay gewannen wir aus den Untersuchungen von Erwachsenen-Normal-Seren, die zum überwiegenden Teil überhaupt keine Verdrängung in unserem System hervorriefen. Außerdem ergaben Verdünnungsreihen verschiedener kommerzieller AFP-Standards (ABBOTT, IDW, BEHRINGWERKE, SERONO) sowie von Hepatom- (Tumor-AFP) und Nabelschnurserum (Fetal-AFP) vergleichbare parallel verlaufende abfallende Verdrängungskurven mit für die untersuchten Standards vergleichbaren bestimmten Konzentrationswerten.

Dieses Verhalten ist ein eindeutiger Hinweis auf die Identität radioimmunologisch untersuchter Antigene mit dem Tracer. Ebenso wie CHAYVIALLE (31) untersuchten wir den Einfluß einer 40 mg/ml konzentrierten Lösung von hochgereinigtem humanen Serumalbumin (Fa. BEHRINGWERKE) auf unser RIA-System und fanden eine geringe Verdrängungsreaktion bis zu 6%. CHAYVIALLE beschrieb für ein anderes kommerzielles Albumin-Präparat eine noch stärkere Verdrängung. Ebenso wie er halten wir dieses Phänomen weniger für ein Zeichen der Verunreinigung unseres Tracers mit markiertem Albumin bzw. unseres Antiserums, da Antigen wie Antikörper im immunologischen Test rein waren, sondern eher für eine mögliche Kontamination der Albumin-Fraktion mit einer Spur AFP bei der labortechnischen Aufbereitung.

Kreuzreaktionen mit anderen Substanzen wie z.B. IgG, HCG,

Transferrin, α_1 -Glykoproteid, Haptoglobin und CEA konnten in AFP-RIA-Systemen bisher nicht gefunden werden (30,31).

Reproduzierbarkeit und Funktionskontrollen

Die bei 10 eigenen Ansätzen ermittelte Standardkurve (Abb. 27) zeigt verhältnismäßig größere Streuungen ihrer Mittelwerte als die von MASSEYEFF (103) wiedergegebene Kurve ($n=6$). Dies erklärt sich wohl vor allem aus den verschiedenen Standardlösungen, die wir testeten. Der Variationskoeffizient identischer Kontrollserien bei verschiedenen Testen liegt mit 14,6% noch in dem Rahmen der von HUNTER angegebenen Grenze bis zu 15%. CHAYVIALLE gibt einen Variationskoeffizienten von 10% (31) bzw. 12,2% (30) an. Die Zehnfachbestimmungen innerhalb eines Testes liegen sehr gut mit Variationskoeffizienten von 2,0% für den hohen und 4,2% für den niedrigen Kontrollwert. Im Vergleich zu CHAYVIALLE mit 7,3% (31) und 7,5% (30).

Die nach dem Logit-Log-Verfahren ermittelten Regressionsgeraden von 10 Testansätzen wiesen alle Korrelationskoeffizienten von größer als - 0,99 bei mindestens sechs Koordinatenpaaren auf. Die A-Werte des Ordinatenabschnittes zeigten mit $4.3649 \pm 0,85$, VK=19,4% eine geringe Streuung. Diese lag noch niedriger für die Steigungen (B) mit $- 2.6767 \pm 0,393$ und einen VK von 14,6%. Der gemittelte Standardfehler der y-Schätzung ($s_{y.x}$) betrug $0,1655 \pm 0,08$ (VK=48%).

Aus diesen Befunden geht hervor, daß die Werte für Ordinatenabschnitt und Steigung bei den verschiedenen Testen, deren radioaktive Substanzen von vier verschiedenen Markierungen stammten, sich gut untereinander vergleichen lassen. Daß die B-Werte absolut von dem aus theoretischen Erwägungen von RODBARD et al. (145) gefundenen Absolutwert von - 2,303 abweichen, spricht für die oben bereits geäußerte Vermutung, daß markiertes und freies Antigen in unserem Assay unter-

schiedliche, jedoch fixierte und reproduzierbare Affinität zum ersten Antikörper besitzen.

6.2 DISKUSSION ZUM KLINISCHEN TEIL

Normalwerte

Bis vor einigen Jahren, als die Nachweisverfahren für AFP noch nicht so empfindlich waren, glaubte man an ein gänzlich Verschwinden von diesem Protein aus dem postnatalen Organismus (4). Untersuchungen mit den hochsensiblen Immunoassays oder Hämagglutinationstesten zeigten jedoch, daß im Serum gesunder Erwachsener AFP in einer sehr geringen Konzentration ebenfalls vorkommt. Nach anfänglicher, wohl von der Methode oder der Kollektivauswahl beeinflussten Ermittlung eines Mittelwertes von 15 ng/ml (139) bzw. 7,6 ng/ml (152), wurde in späteren Arbeiten ein niedrigerer Normalspiegel mit $2,3 \pm 1,6$ (103,104) und $3,8 \pm 1,3$ (31) ng/ml bei jeweils über 100 Fällen gefunden.

Unsere Konzentrationsmessungen von 140 Seren ergaben in 86,4% der Fälle Werte unter 5 ng/ml und einen Höchstwert von 14 ng/ml bei den restlichen 13,6%. Damit liegen wir in einem Bereich, der sich nicht wesentlich von den in Tabelle 10 angegebenen unterscheidet. Differenzierungen innerhalb des Kollektivs nahmen wir nicht vor, doch sei erwähnt, daß andere Autoren keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern fanden (30,31,104), wohl aber in den Altersgruppen. Allerdings widersprechen sich die diesbezüglichen Angaben von CHAYVIALLE et al. (30), die eine Korrelation Alter/Serumkonzentration ermittelten und von MASSEYEFF, der jenseits des 60. Lebensjahres eine leichten, aber doch signifikanten Abfall des AFP-Spiegels feststellte (104).

Bezüglich der Verteilungsform wurden von PURVES und Mitarb. (140) eine Log-Normalverteilung beobachtet. In unserem Kollektiv war eine eindeutige Aussage über die Verteilungsform nicht möglich, da 86,4% der Fälle unter der sicheren unteren

Empfindlichkeitsgrenze lagen und damit in ihrer Verteilung nicht weiter differenziert werden konnten. Die Beobachtung jedoch, daß sich 13,6% der Werte bis zu einer Konzentration von 14 ng/ml erstreckten, könnte als Hinweis auf eine vorliegende Log-Normalverteilung gewertet werden.

Die in der Literatur mitgeteilten Normbereichs-Unterschiede sind sicherlich in erster Linie methodisch bedingt, wobei die Verwendung verschiedener Standards eine große Rolle spielen dürfte. Auf das Fehlen einer international gültigen Vergleichssubstanz wurde in anderem Zusammenhang bereits hingewiesen.

- 94 -
 RADIOIMMUNOLOGISCHE AFP-BESTIMMUNG IM SERUM VON
 NORMALPERSONEN

(AFP-Konzentration in ng/ml)

Autor, Land, Jahr (Ref.)	N	$\bar{x}$	$\pm s$	Bereich
RUOSLAHTI & SEPPÄLÄ Finnland 1972 (152)	32	7,6	6,6	1 - 14
PURVES & PURVES Südafrika 1972 (139)	73	15		2 - 26
1973 (140)	?			- 16,5
ISHIGURO & NISHIMURA Japan 1973 (57)	36 ¹			- 7
CHAYVIALLE et al. Frankr. 1973 (30)	105	2,3	1,2	
1974 (31)	136	3,8	1,3	
LAFON et al. Frankr. 1973 (79)	100 ²			- 5
JOHANNSSON et al. Schweden 1974 (59)	14	5,1		0,1 - 13,9
GASSNER & GROB Schweiz 1974 (41)	60 ²			59 unter 5
DELMONT et al. Frankr. 1974 (34)	100			96 unter 5 4 bis 8
WALDMANN & McINTIRE USA 1974 (186)	210 ²			- 40
KOBAYASHI Japan 1974 ()	?			- 9,1
JONSSON & KRONVALL Schweden 1974 (60)	96			63,5% unter 5
MASSEYEFF et al. Frankr. 1974 (103, 104)	192	2,6	1,6	
TONAMI et al. Japan 1975 (178a)	24			- 30
Eig. Beobacht. BRD 1975	140 ³			86,4% unter 5 13,6% bis 14

1: junge Frauen; 2: Blutspender; 3: vorwiegend Rekruten

TABELLE 10

AFP bei primären Leberzell-Carzinomen

Das primäre Leberzell-Carzinom gehört zu den in Westeuropa selteneren malignen Erkrankungen, in Afrika und Südostasien dagegen macht es 30-50% aller Tumorfälle aus (95). Die Ursachen für die dortige Häufigkeit ist nicht in einer früher vermuteten spezifischen Rasseneigenschaft zu suchen, sondern auf exogene Einflüsse wie Nahrung (Aflatoxine u.a.) oder Infektionskrankheiten zurückzuführen. In Europa entsteht das Leberkarzinom häufig auf dem Boden eines zirrhotischen Umbau des Leberparenchyms (161). Das unterstreicht die Bedeutung der AFP-Bestimmung als Suchmethode nach Hepatomen. 76% von unseren 18 Patienten mit PLC gingen mit Leberzirrhosen einher; dieser Befund lässt sich gut vergleichen mit der Obduktionsstatistik von MAC SWEEN (45) aus Großbritannien (77%), dagegen wurde in einer analogen Arbeit aus der DDR (146) nur bei 40% eine Leberzirrhose gefunden. Geschlechtswendigkeit (m: w = 4:1) und Alterverteilung (Gipfel 50-70 J) unseres Tumorpatientengutes stimmen mit diesen Untersuchungen gut überein.

Auf die Beziehung zwischen α -Fetoprotein und Hepatom wiesen schon grob quantitative Suchmethoden hin. In einer großen Studie der WHO waren von 247 PLC-Fällen 75,2% AFP positiv (76). Die AFP-Auffindungsrate der mit der Mikro-OUCHTERLONY-Technik erfolgten Untersuchungen liegt zwischen 31 und 93%, durchschnittlich zwischen 40 und 70%. Eine umfassende Zusammenstellung dieser Ergebnisse bietet die Übersicht von LA-MERZ und FATEH-MOGHADAM (82). Mit steigender Empfindlichkeit der Nachweismethoden (Latex-Agglutination, Überwanderungselektrophorese, passive Hämagglutination und Radioimmunoassay) konnte der Prozentanteil der positiven Resultate 100% erreichen.

Wie die Tabelle 11 zeigt, weichen die Ergebnisse der bisher veröffentlichten radioimmunologischen Untersuchungen in nicht besonders gravierendem Umfang von einander ab, was auf Brauch-

RADIOIMMUNOLOGISCHE AFP-BESTIMMUNGEN IM SERUM VON
PATIENTEN MIT PRIMÄREM LEBERZELLKARZINOM
(AFP-Konzentration in ng/ml)

Autor, Land, Jahr (Ref.)	N	% unter 20ng/ml	<20	20-100	100-500	500- 10000	>10000 ¹	% über 10000
RUOSLAHTI et al. Finnland 1972 (751)	14	14%	2		3		9	64%
1974 (755)	24	21%	5	2	3	2	11	46%
NISHI u. HIRAI Japan 1973 (144)	78	17%	13	8	5	13	39	50%
ENDO et al. Japan 1973 (36)	20	5%	1		5	14		
SASKI et al. Japan 1973 (756)	36	17%	6		3	4	23	64%
ISHII Japan 1973 (58)	107	7%	8	100 ²	?	?	?	?
KAWATA et al. Japan 1973 (765)	31	9%	2	1	29 ³	?	?	?
KASAI et al. Japan 1973 (764)	36	17%	6	2	1	1	26	72%
CHAYVIALLE et al. Frankr. 1973 (30)	22	23%	5			17		?
1974 (37)	34	31%	1		3	3	27	79%
BLOOMER et al. USA 1973 (24)	130	46 ⁴	35 ⁴	95 ⁵	?	86 ⁶	?	?
1975 (25)	75	31%	23	4	5	10	33	44%
WOODFIELD et al. Austral. 1974 (789)	51	2%	1	2			48	94%
HIRAI et al. Japan 1974 (52)	39	33%	13	8	5	13 ⁶	?	?
KOHN u. WEAVER Grossbr. 1974 (76)	107	8%	9	2	2	90		?
MASSEYEFF et al. Frankr. 1974 (705)	58	10%	6		17		35	60%
DELMONT et al. Frankr. 1974 (34)	9	44%	4	1	2	1	1	11%
GASSNER u. GROB Schweiz 1974 (47)	35	11%	4	3	4	24 ⁶	?	?
WALDMANN&McINTIRE USA 1974 (786)	150	29%	57			27 ⁷	66 ⁸	?
TONAMI et al. Japan 1975 (778)	27	19 ⁹	5 ⁹		4	10	8	30%
Eig. Beobacht. BRD 1975	18	6%	1	2	1	7	7	39%

¹ Bestimmung meist mit OUCHTERLONY-Test, einf. rad. Immunodiffusion o. Elektroimmunodiffusion durchgeführt; ² >15,6 ng/ml; ³ 320 ng/ml; ⁴ <40 ng/ml; ⁵ >40 ng/ml; ⁶ >500 ng/ml; ⁷ zw. 40 u. 3000 ng/ml; ⁸ >3000 ng/ml; ⁹ <30 ng/ml.

barkeit und Reproduzierbarkeit des AFP-RIA schließen läßt. Auf gewisse Unterschiede, die u.a. den geringen Fallzahlen zuzuschreiben sind, sei dennoch kurz eingegangen. Einen Wert unter 20 ng/ml fanden wir nur bei einer Patientin mit PLC. Diese Untersuchung erfolgte 2 Jahre nach Lobektomie des infiltrierten Leberlappens, sodaß dieser Fall nicht mit den anderen, bei denen ein tumoröses Geschehen mit Sicherheit vorlag, vergleichbar ist. Kein PLC-Patient hatte demnach einen im Normbereich liegenden AFP-Spiegel, ein Befund, den nur noch CHAYVIALLE (29) bei 34 untersuchten Fällen mitteilt. Dagegen fanden alle übrigen Autoren AFP-Serumkonzentrationen unter 20 ng/ml zwischen 2-17%. Bei 39 OUCHTERLONY negativen Patientenserien lag dieser Anteil bei 33% (52). Der Anteil von 16,5% im erhöhten Bereich zwischen 20 und 500 ng/ml stimmt mit NISHI et al. (114) genau überein, ähnliche Ergebnisse mit einer Häufigkeit zwischen 12 und 25% berichten 4 Autoren (22,25,36,155), jedoch liegt dieser Prozentsatz bei anderen (30,76,189) wesentlich niedriger. Im als stark erhöht zu geltenden Konzentrationsbereich ab 500 ng/ml (bis 600 mg%), in welchem 77% der von uns untersuchten Hepatopatieneten lagen, schwanken die Angaben der anderen Autoren zwischen 53 und 94%, $\bar{x} = 70,4 \pm 11,8\%$.

Da der Radioimmunoassay die exaktere Methode darstellt, finden wir bei diesen Untersuchungen eine größere Übereinstimmung der Häufigkeit als der nicht standardisierten Methoden.

Wir konnten, wie auch andere Autoren, (34,52,76,151) weder zur Größe, dem Differenzierungsgrad, der Metastasierung, der Prognose, der zirrhatischen Beteiligung, noch zu serologischen Parametern eine Beziehung der AFP-Serumkonzentration finden. MASSEYEFF (100) und andere (63,92,141,174) halten eine positive Korrelation zwischen AFP-Spiegel und Tumorgewicht für möglich : 50% positive Fälle bei weniger als 2 kg, 100% bei weniger als 5 kg Tumorgewicht. Andere Autoren (100, 138) fanden hier keinen Zusammenhang. LEHMANN (87) konnte

dagegen eine Beziehung von AFP-Tumorgehalt zur AFP-Serumkonzentration nachweisen.

Bei Fortbestehen der Erkrankung konnten wir im Verlauf einen Anstieg des AFP-Spiegels beobachten. Nach operativer oder zytostatischer Behandlung wird ein Absinken des AFP-Wertes berichtet. Ein Wiederaanstieg spricht für ein Tumorezidiv.

Für das Wiederauftreten des fetalen Proteins in Leberkarzinomen wurden verschiedene Hypothesen und Synthesen aufgestellt. Aus einigen Befunden geht einwandfrei hervor, daß α -Fetoprotein in Tumorzellen gebildet wird: Fluoreszenzoptisch war AFP zwar im Zytoplasma von Tumorzellen (4,17,32) nachweisbar, aber nicht einer definierten Zellart (z.B. nach Differenzierungsgrad) zuzuordnen. AMO et al. (17) fanden AFP sowohl in Hepatomzellen des II. und III. Grades nach Edmonson, als auch in normalen Hepatozyten, die allerdings in der Nähe der Tumorzellen lagen. Konträr dazu stehen die Befunde von URIEL und Mitarb. (181,183,184), die AFP indirekt unter Ausnutzung seiner östrophilen Eigenschaft durch Zellaффinitätsmessungen mit Tritium-markierten Östrogenen bestimmten und es sowohl beim humanen primären Leberzellkarzinom als auch beim Rattenhepatom weder in malignen noch normalen Hepatozyten nachweisen konnten. Dagegen fanden sie es in sogenannten Übergangszellen (kleinen runden bis ovalen Zellen mit elongiertem oder nierenförmigem Nukleolus), die an der normalen Leberregeneration teilnehmen in 1-2% der gesamten Leberzellpopulation. Daraus ziehen die Autoren den Schluß, das AFP nur im Übergangsstadium der Leberzelldifferenzierung produziert und sezerniert wird, einer Auffassung, die in den neueren Arbeiten allgemein geteilt wird. Die Hypothesen, die in früheren Veröffentlichungen diskutiert wurden, sind in der Übersicht von MASSEYEFF (101) ausführlich referiert worden: Hepatoblasten=persistierende Embryonalzellen als AFP-bildende Zellen (ABELEV, 3,4,7), Rückdifferenzierung von Hepatozyten (URIEL, 179,180), Verbleiben von noch undifferenzierten Stammzellen (PIERRE, 135). Als Mechanismus für die neuerliche AFP-

Sekretion wird ferner von GRABAR (47) die Depression eines zuvor reprimierten Gens, welches die AFP-These steuert, angenommen.

Die Tatsache, daß auch PLC-Tumoren ohne oder nur mit geringer AFP-Erhöhung einhergehen können, und daß auch bei nicht malignen Leberschädigungen AFP übernormal und mit einer gewissen Gesetzmäßigkeit (s.unten) sezerniert wird, wirft die Frage auf, in wie weit überhaupt ein obligater Zusammenhang zwischen AFP-Synthese und Leberzellentartung angenommen werden kann. Nach URIEL (179) wird AFP von allen Hepatozyten in einem gewissen Differenzierungsstadium gebildet, im Fall des Hepatoms soll eine Störung der Differenzierung oder der Differenzierung der Hepatozyten auf die Stufe der AFP-Bildung führen. Es wäre denkbar, daß bei einigen Tumorzellen die Entartung der Zellteilungsregulation und die Störung der Zelldifferenzierung miteinander gekoppelt sind, bei anderen jedoch nicht. Da keine Korrelation zwischen AFP-Serumkonzentration und Tumorgröße/Wachstum gesichert werden konnte, müßte man für jene Koppelung Zufallscharakter annehmen. Ähnlich argumentiert RUOSLAHTI (151). Ob bei Hepatomen mit mäßig erhöhtem AFP-Gehalt im Serum dieses von entarteten Hepatozyten stammt oder durch eine erhöhte Regenerationsrate am Rande von Tumordinfiltrationsarealen (vgl. Befunde von AMO et al.(17)) zustande kommt, muß noch offen bleiben.

RIA und PLC

Die durch die radioimmunologischen Verfahren gewonnene Erkenntnis, daß nicht nur primäre Leberkarzinome erhöhte AFP-Spiegel aufweisen, jene aber auch AFP-unauffälliges Verhalten zeigen können, wirft die Frage nach der diagnostischen Relevanz dieser sehr empfindlichen Methode auf. Sicherlich ist eine AFP-Erhöhung im 5-500 ng/ml-Bereich nicht für Hepatome oder Teratome beweisend, oberhalb von 500 ng/ml erreicht sie jedoch nach unseren Erfahrungen eine sehr hohe Treffsicherheit, da wir solche Werte nur beim PLC und Teratokarzinom beobachteten. Da ein solcher Konzentrationsbereich aber auch

nur von nicht weniger aufwendigen Bestimmungsmethoden erfasst werden kann, erscheint uns die radioimmunologische Untersuchung, besonders auch wegen der unten besprochenen Tumorsuche bei Patienten mit Leberzirrhose eine wertvolle diagnostische Hilfe zu sein. Nicht zu ersetzen ist sie jedoch bei der Kontrolle von therapeutischen Maßnahmen, wenn die Früherkennung dieses früher als prognostisch infaust geltenden Karzinoms mit Hilfe der AFP-Bestimmung gelingt. Dann bietet nur die radioimmunologische Verlaufsbeobachtung die Gewähr, ob das tumorassoziierte Protein in den Normbereich zurückfällt oder nicht.

Sekundäre Lebermetastasen

Schon mit weniger empfindlichen Nachweismethoden wurden vereinzelt AFP-positive Serumreaktionen bei Tumoren mit sekundären Lebermetastasen beobachtet (23,27,80,86,87). Mittels den sensiblen den Normalbereich tangierenden Techniken konnten dagegen bei einer weitaus größeren Anzahl dieser Fälle ein erhöhter AFP-Spiegel ermittelt werden, wie die Tabelle 13 zeigt. Bis auf einen (30) fanden alle Autoren bei 9-42% dieser Patienten Werte über 20 ng/ml wovon die meisten im Bereich bis 100 ng/ml lagen. Unsere Untersuchungen, die bei 6 von 15 (40%) Patienten mit gesicherten Lebermetastasen mäßig erhöhte AFP-Konzentrationen zwischen 22 und 111 ng/ml ergaben, sind damit gut vergleichbar.

Weitaus höhere AFP-Spiegel bei anderen als Lebertumoren mit oder Metastasierung in die Leber erhielten WALDMANN und Mitarb. (110,186) mit Werten über 40 ng/ml bei 23% von 44 Karzinomen des Pankreas, 18% von 91 des Magens, 5% von 193 des Kolons und 7% von 150 Bronchialkarzinomen. Drei Fälle lagen zwischen 10 000 und 125 000 ng/ml, die übrigen blieben unter 3000 ng/ml. Ähnlich hohe Werte werden auch von anderen Autoren für einzelne Fälle mitgeteilt (16,33,66,76,126,155,178). Vor allem die Tatsache der AFP-Sekretion bei Tumoren, bei denen eine Leberbeteiligung weder klinisch noch histo-

logisch eruiert werden konnte, weist auf extrahepatische AFP-Synthese hin. Von den Teratokarzinomen, für deren AFP-Bildung embryonale Dottersackstrukturen angenommen werden, sei in diesem Zusammenhang abgesehen. Einige Autoren (34, 110, 151, 186) halten in den beobachteten Fällen von Magenkarzinom deren Tumorzellen für die Quelle des AFP, wobei ein ähnlicher Mechanismus wie für die Hepatomzellen diskutiert wird (Depression eines reprimierten Genoms). Da α -Fetoprotein im gesamten embryonalen Gastrointestinaltrakt produziert wird, wäre eine solche Parallele bei maligne entarteten Zellen des Magen-Darm-Traktes durchaus denkbar. Analog argumentiert TSUNG (178) bei einem Bronchialkarzinom, da auch die Lungenzellen entwicklungsgeschichtlich dem Gastrointestinaltrakt entstammen würden.

RADIOIMMUNOLOGISCHE AFP-BESTIMMUNGEN IM SERUM VON PATIENTEN
MIT LEBERMETASTASEN
(AFP-Konzentration in ng/ml)

Autor, Land, Jahr (Ref.)	N	% über 20ng/ml	<20	20-100	100-500	> 500
RUOSLAHTI&SEPPÄLÄ Finnland 1972 (154)	19	16%	16	3		
RUOSLAHTI et al. Finnland 1974 (155)	79	9%	72	7 ⁶		
NISHI u. HIRAI (52) Japan 1973 (114)	8	25%	6	2		
ISHII Japan 1973 (58)	54	20%	43 ¹	11 ²		
LAFON et al. Frankr. 1973 (79)	23		7 ³	16 ⁴		
DELMONT et al. Frankr. 1974 (34)	17	12%	15	1	1	
CHAYVIALLE et al. Frankr. 1974 (31)	19	21%	15	4		
MASSEYEFF et al. Frankr. 1974 (105)	51	27%	37	8	4	2
OKAMOTO Japan 1974 (126)	12	58%	5	5 ⁵		
TONAMI et al. Japan 1975 (178a)	42 ⁹ 21 ¹⁰	26% ⁸ 5%	31 ⁷ 20	5	3 1	3
Su.	63	10%	51	5	4	3
Eig. Beobacht. BRD 1975	15	40%	9	5	1	

1 <15,6 ng/ml; 2 >15,6 ng/ml; 3 <6,4 ng/ml; 4 6,4 - 200 ng/ml; 5:23-320 ng/ml; 6 >25 ng/ml; 7 <30 ng/ml; 8 >30 ng/ml; 9:Pat. mit Magen-Ca 10: andere

TABELLE 13

OKAMOTO (126) weist auf eine histologische Ähnlichkeit der Tumorzellen von AFP-positiven Adenokarzinomen des Magens mit Hepatomzellen des trabekulären Typs hin.

Für die weniger stark erhöhten AFP-Spiegel bei sekundären Lebermetastasen wird dagegen eine erhöhte Regenerationsaktivität der Leber um die Tumoringeln verantwortlich gemacht (34,110,151). Auch unsere Befunde bei den entzündlichen Lebererkrankungen und Teilhepatektomien (s.u.) machen diese Interpretation wahrscheinlich. Histologisch gestützt wird sie von dem immunfluoreszenzoptischen Nachweis des AFP in Hepatozyten in der Umgebung von Metastasen eines Lungenkarzinoms in der Leber.

Leberzirrhose

Bei unseren Untersuchungen von 102 Patienten mit Leberzirrhose fanden wir 12 über 20 ng/ml erhöhte AFP-Serumkonzentrationen. Dieses Ergebnis wird von den meisten anderen Autoren gestützt (vergl. Tab. Nr. 14). Lediglich NISHI und KAWATA (65,114) beobachteten bei einer größeren Anzahl von Patienten AFP-Spiegelerhöhungen. Der Bereich, in dem diese Werte liegen, erstreckt sich hauptsächlich bis 100 ng/ml und unterscheidet sich damit nicht wesentlich von dem bei Lebermetastasen.

Wir konnten ferner feststellen, daß zwischen der Normalgruppe und dem Leberzirrhose-Kollektiv ein signifikanter Unterschied im Bereich zwischen 5 und 20 ng/ml besteht ($p < 0,001$).

Zu demselben Ergebnis ($< 0,005$) kommen DELMONT et al. (34), die einen Durchschnittswert von den nicht über 20 ng/ml Erhöhten mit 8 ng/ml, 15,2 ermittelten, wozu unser analog errechneter Wert von $8,2 \pm 8$ ng/ml sehr gut passt. Andere Veröffentlichungen berichten über diesen Gruppenvergleich nicht.

Die Erhöhung des AFP, die transistorischer Natur sein kann (93), wird allgemein mit Regenerationsvorgängen im Leberparenchym als Folge der Leberzellnekrosen in ursächliche Verbindung gebracht (31,34,52,76,155). Die im Vergleich zu Normalseren mäßig vermehrte AFP-Produktion bei fast allen Patienten mit Leberzirrhose ließe sich in diesem Sinne mit dem chronisch progressiven Verlauf dieses pathologischen Geschehens in Zusammenhang bringen.

Autor, Land, Jahr (Ref.)	N	% über 20ng/ml	< 20	20-100	100-500	>500
RUOSLAHTI et al. Finnland 1972 (154)	13	15%	11	1	1	
RUOSLAHTI et al. Finnland 1974 (155)	61	15%	52		9	
NISHI u. HIRAI (52) Japan 1973 (174)	38	47%	20	15	3	
ISHII Japan 1973 (58)	139	27%	101	38		
KAWATA et al. Japan 1973 (65)	25 ¹ 44 ²	68% 32%	8 30	11 12	3 1	5 1
BLOOMER et al. USA 1973 (24)	84	17%	70 ³	14 ⁴	?	?
SILVER et al. Kanada 1974 (164)	13 28 37	 4% 8%	13 ⁵ 27 ⁶ 34 ⁷	 1 3		
GASSNER u. GROB Schweiz 1974 (41)	100	12%	88	11	1	
DELMONT et al. Frankr. 1974 (34)	52	2%	51		1	
CHAYVIALLE et al. Frankr. 1974 (31)	33	6%	31	2		
TONAMI et al. Japan 1975 (173a)	75	20% ⁹	60 ⁸	10	4	1
Eig. Beobacht. BRD 1975	102	12%	90	11	1	

1 = aktive LZ; 2 = inaktive LZ; 3 <40 ng/ml; 4 >40 ng/ml; 5 = prim. bil.LZ;
6 = kryptogene LZ; 7 = alkoholische LZ; 8 <30 ng/ml; 9 >30 ng/ml.

Tab. Nr. 14: Radioimmunologische Bestimmungen bei Lebercirrhose

Die Bedeutung der radioimmunologischen AFP-Bestimmung bei Leberzirrhose liegt besonders in der Früherkennung und -erfassung von primären Leberzellkarzinomen, die sich klinisch noch unauffällig verhalten. Wir stellten bei drei Patienten (≈ 32) dieser Gruppe (Werte über 3000 ng/ml) die Verdachtsdiagnose PLC, welche sich später histologisch bestätigte. LEHMANN und Mitarb. (93) selektierten durch AFP-Untersuchung (passive Hämagglutination, RIA) aus 215 Leberzirrhosepatienten 8 PLC-Fälle (3,7%); bei anderen Autoren waren Hepatome bei Patienten mit erhöhten AFP-Konzentrationen nicht auszuschließen (34,41). Aus den vorliegenden Ergebnissen geht die Bedeutung der AFP-Bestimmung eindeutig hervor. Eine länger bestehende Leberzirrhose soll mindestens alljährlich einmal ~~min~~ radioimmunologisch auf AFP untersucht werden, um die Entstehung eines primären Leberzellkarzinoms frühzeitig zu erkennen und entsprechend therapieren zu können.

Hepatitis

Eine transitorische Erhöhung des α -Fetoproteins bei akuten Virushepatitisfällen wurde zuerst von MASOPUST (98) 1968 bei kindlicher Hepatitis und von GEFROY (42) bei Erwachsenen vereinzelt festgestellt. Genauere Untersuchungen bestätigten dies in einer Vielzahl von Fällen ebenso wie wir (29,34,155,164, 171,172). Die AFP-Werte sind dabei nur selten über 500 ng/ml erhöht (vgl. Tab. Nr.15), wir beobachteten in einem Fall einen AFP-Spiegel von 228 ng/ml.

Bei 65% von den 31 Verlaufsuntersuchungen der akuten Hepatitis beobachteten wir Werte über 20 ng/ml. SMITH u.Mitarb. (171) berichten, daß 11 von 15 Patienten (73%) mit akuter Virushepatitis B einen transitorischen AFP-Anstieg zeigten, gemessen mittels Sandwichcounter Immunelektrophorese in Agarose mit einer Empfindlichkeit über 100 ng/ml. Andere Autoren geben eine geringere Häufigkeit über 20 ng/ml an (s.Tab.15). Das kann u.a. auf den Zeitpunkt der Messung zurückzuführen

sein, da nach unserer Erfahrung das AFP nur durchschnittlich 3 Wochen lang erhöht nachweisbar ist. Die von uns ermittelte Häufigkeitsrate bei Einzelbestimmungen (46% von 63 Patienten) steht in guter Übereinstimmung mit anderen Untersuchern (31,34,52,58,114,163).

Wir konnten kein signifikant unterschiedliches Verhalten in Bezug auf AFP-Produktion zwischen den Australia-Antigen-positiven und -negativen Hepatitisformen feststellen und auch ALPERT et al.(14), CHAYVIALLE (71), SILVER et al. (164), RICHTER et al. (143) und BLOOMER et al.(25). Dagegen fanden DELMONT et al. (34) AuAG vermehrt bei den Patienten mit erhöhten AFP-Spiegeln, SMITH (171) untersuchte nur Fälle mit Hepatitis B, die zu 73% AFP positiv waren und CASSUTO et al. (29) ermittelten eine durchschnittliche Serumkonzentration $\bar{x} = 20$ ng/ml bei Hepatitis B und $\bar{x} = 14$ ng/ml bei Hepatitis A. Diese Autoren glauben aufgrund ihrer Befunde einen Hinweis in Richtung der Hypothese erbracht zu haben, daß das Hepatitis B-Virus in der Ätiologie des primären Leberzellkarzinoms eine Rolle spielen könnte.

Eine positive Korrelation zu den Transaminasen wurde weder von uns noch von anderen Autoren beobachtet. Daß ein AFP-Anstieg jeweils nach den Maximalkonzentrationen dieser Enzyme erfolgt (wir ermittelten eine durchschnittliche zeitliche Differenz von $9,8 \pm 4$ Tagen), bestätigen einige Arbeiten (25, 29,67,143,163,164,174); nach SILVER betrug der Abstand zum AFP-Gipfel 5-16 Tage nach dem SGPT-Peak (163). Eine Beziehung zur Höhe des AFP-Spiegels wurde für Prothrombin-Erniedrigung festgestellt (63), nicht jedoch für SGPT, SGOT, Bilirubin, den Serumproteinen und zum Quickwert (25,31,143). Nach SILVER (163) soll zur Transaminase SGPT eine gewisse Beziehung bestehen. Zu dem von uns gefundenen Zusammenhang zwischen AFP-Verlauf und dem Verhalten der Cholinesterase gibt es in der Literatur keine vergleichbaren Ergebnisse. Das reziproke Verhalten dieses von der Leber synthetisierten Ferments läßt sich zwar für die Wiederanstiegsphase mit der

RADIOIMMUNOLOGISCHE AFP-BESTIMMUNGEN IM SERUM VON
PATIENTEN MIT HEPATITIS
(AFP-Konzentration in ng/ml)

Autor, Land Jahr (Ref.)	Hep.-Typ	N	% über 20 ng/ml	≤20	20-100	100-500
RUOSLAHTI et al. Finnland 1972 (157)	fulminant	2				2
1973 (155)	akut	19	16%	16	3	
1974 (155)	akut chronisch	25 21	20% 10%	20 19		5 2
ISHII Japan 1973 (58)	akut	136	35%	47 ¹		
NISHI u. HIRAI (52) Japan 1973 (174)	akut chronisch	27 35	45%	34	21	5(+2)
KAWATA et al. Japan 1973 (65)	chronisch- aktiv	15	47%	8	5	2
KEM et al. Südafrika 1973 (67)	akut	32		1	3 ²	
BLOOMER et al. USA 1973 (24)	subakut klassisch drogeninduz. alkoholisch	50 100 16 40	12% ³ 27% 31% 15%		6 ³ 27 5 6	
1975 (25)	klassisch subakut nekrot.	101 75	29% 51%	72 37	29 29	(+9)
SILVER et al. Kanada 1974 (763)	persist. chronisch- aktiv	19 48	11% 33%	17 32	1 16 ⁴	1
1974 (764)	akut	128	31%	88	26	14
CASSNER u. GROB Schweiz 1974 (41)		100	13%	87	10	3
DELMONT et al. (34) Frankreich 1974	alkoholisch Virus-	9 17		9 35%	9 11	6
CHAYVIALLE et al. Frankr. 1974 (31)	Virus-	28	46%	15	10	3
RICHTER u. OHLEN BRD 1975 ()		60	58% ⁵	25 ⁵	35 ⁵	
TONAMI et al. Japan 1975 (178)	akut chronisch	28 50	21% ⁶ 2%	2 ⁶ 49	2 ⁶	2(+2) 1
Eig. Beobacht. BRD 1975	chronisch akut (Einzel) akut (Verl.)	7 63 31	57% 32 65%	3 43 11	4 18 15	2 2 5

1 <15,6 ng/ml; 2 "ansteigend"; 3 <bzw. >40 ng/ml; 4 zw. 23 u. 4210 ng/ml
5 <bzw. >10 ng/ml; 6 <bzw. >30 ng/ml

Leberparenchymrestitution erklären, nicht aber das anfängliche verhältnismäßig späte und mit der AFP-Erhöhung korrelierende Absinken. Gesamtbilirubin ist nach unseren Untersuchungen bereits vor dem AFP-Anstieg stark erhöht, SMITH (171) ermittelte eine durchschnittliche Distanz von 1,3 Wochen zwischen Bilirubin-Peak und AFP-Positivität), sinkt jedoch in etwa parallel mit dem AFP wieder ab. Im Gegensatz zu SMITH (171) stellten viele Autoren eine Relation zwischen AFP-Serumkonzentration und Schwere der Hepatitis fest (25,62,63,143,163,164). Höhere AFP-Werte als die in größeren Studien ermittelten (s.o.) wurden in Einzelfällen bei Alkohol induzierter Hepatitis gefunden (111,112). Die Autoren diskutieren auch hier als Grund Regenerationsvorgänge, da die Hepatozyten-Regeneration das Hauptzeichen der alkoholischen Hepatitis sei (111).

Bei Krnakheitsbildern, die einer chronischen Hepatitis entsprachen, fanden wir mäßig erhöhte AFP-Spiegel in 4 von 7 Fällen, andere Autoren bei 38% (164), 10% (155), 23% (16). In Fällen von massiven Leberzellnekrosen wurden bei 44% (16) bzw. 52% (25) deutliche AFP-Anstiege beobachtet.

Die Antwort auf die Frage nach dem Grund des zeitweiligen AFP-Konzentrationsanstieg erfolgt bis auf zwei Untersucher einheitlich. Jene (16,29) halten einen spezifischen Viruseinfluß auf die Leberzelle für möglich, der die AFP-Synthese verursacht. Alle anderen hingegen nehmen an, daß die AFP-Sekretion mit der Leberzellregeneration zusammenhängt, zumal sie zeitlich mit der pathologischen Reihenfolge einer Hepatitis mit Entzündungsstadium, Nekrose und Regenerationsphase gut in Einklang zu bringen ist (25, 31,34,52,63,68,111,155,163,164,171,172).

SMITH (171,172) diskutiert eine Genrepression während der reparativen Periode bei rascher hepatozellulärer Hyperplasie. Ob die AFP-Serumkonzentration ein Maß für die Regenerationsgeschwindigkeit ist oder vom Ausmaß der Leberschädigung abhängt, läßt sich anhand unserer Untersuchungsergebnisse nicht entscheiden. KARVOUNTZIS und REDEKER (63) deuten einen AFP-Anstieg

bei schwerer Hepatitis als Ausdruck einer ausgeprägten Leberzellregeneration nach ausgedehnter Nekrose, während ein fehlender AFP-Anstieg bei fulminanter Hepatitis als prognostisch ungünstiges Zeichen zu werten sei.

Diagnostisch wertvoll ist die AFP-Untersuchung besonders in Fällen wo ein Persistieren der AFP-Erhöhung im Serum den Übergang der akuten Hepatitis in die chronische Verlaufsform anzeigt.

Partielle Hepatektomie

Nach unseren Untersuchungen führt eine partielle Hepatektomie beim Menschen oder auch nur eine intensive Manipulation an der Leber (Darstellung des Leberhilus) zu einem ausgeprägten Transitorischen AFP-Konzentrationsanstieg im Serum innerhalb von 1-3 Tagen post operationem. Der AFP-Anstieg liegt in 5 Fällen in einem Konzentrationsbereich (bis 5625 ng/ml), der sonst fast nur von Hepatomen und teratogenetischen Geschwülsten erreicht wird. Andere chirurgische Eingriffe unter gleicher Narkosebelastung scheinen diese Erhöhung der AFP-Sekretion nicht zu verursachen. Beim Menschen wurden AFP-Erhöhen nach partieller Hepatektomie nur in Einzelfällen (26,106,172) oder gar nicht (16) beobachtet.

Der von SMITH (172) beschriebene AFP-Konzentrationsanstieg bei einem Patienten nach Hepatektomie wegen eines Lebertraumas zeigte sich unter Verwendung der Sandwich-Gegenstromelektrophorese erst am 6. und 7. Tag p.Op. und lag maximal bei 500 ng/ml. Dieser Fall verlief in etwa parallel zu dem von uns mit Nr.8 bezifferten, bei dem ebenfalls am 6.Tag der AFP-Maximalwert (648 ng/ml) gefunden wurde.

Die anderen Befunde stimmen im wesentlichen überein mit den Untersuchungsergebnissen von ABELEV (2,4) und anderen während der Regenerationsphase 2 Tage nach Hepatektomie bei erwachsenen Mäusen und Ratten (158) sowie 4 Tage nach CCl_4 -Inhalation bei Ratten (52).

Wie wir in einem Fall zeigen konnten, steigt die AFP-Konzentration bereits Stunden nach dem Eingriff als Antwort auf das

gesetzte Trauma im Lebergewebe steil an. Die Transaminasen, die als Folge der Zellschädigung kurzzeitig erhöht waren (bis 40 mU/ml) fallen wie bei den Hepatitiden in Richtung auf die Norm zurück, während die AFP-Konzentration steigt. Die Synthesekapazität der Leber, repräsentiert durch die Cholinesterase - und Transferrinkonzentration ist zum Zeitpunkt des AFP-Maximums vermindert. Eine enge Bindung oder Proportionalität der anderen Serum-Metaboliten war nicht zu erkennen.

Der Abfall der Harnsäure, einem Endprodukt des Purinnukleotidabbaus, im Blut kann im Zusammenhang mit einer gesteigerten Leberzellregeneration als vermehrte Verwendung der präformierten Nukleotide in der Leber gedeutet werden.

Das Phänomen der transitorischen AFP-Konzentrationserhöhung nach Hepatektomie möchten auch wir im Zusammenhang mit den Befunden von URIEL et al. (s.o.) und tierexperimentellen Untersuchungen als Ausdruck einer rasch und intensiv einsetzenden Leberregeneration deuten. Unsere Beobachtung, daß bei 5 Fällen mit Hämodilutin AFP-Werte von über 2750 ng/ml, bei den 2 ohne Hämodilutin jedoch maximal 650 ng/ml festgestellt wurden, läßt einen Zusammenhang zwischen Blutverdünnung und AFP-Synthese und/oder Leberzellregeneration vermuten. So wäre es denkbar, daß eine die Leberzellneubildung inhibierende im Kreislauf zirkulierende Substanz existiert, welche durch die Hämodilution vermindert wird, was eine überschießende Zellregeneration zur Folge hätte. Zur Weiterarbeit in dieser Richtung fehlen uns aber noch AFP-Untersuchungen bei hämodilutierten Patienten, die nicht an der Leber operiert wurden.

Die von uns ermittelte Halbwertszeit des AFP zwischen 5 und 8 Tagen entsprechen einigen in der Literatur angegebenen Werten nach partieller Hepatektomie und Lebertransplantation sowie bei post partum Frauen (53,78,107,100,124,160), während sie länger sind als einige Werte bei Frauen nach Geburt (zwischen 2,4 und 3,9, s.dazu 50) und den von ALPERT und Mitarb. (10) bei einem hepatektomierten und lebertransplantierten Hepatom-Patienten gefundenen Wert von 2 Tagen.

7. Zusammenfassung

α -Fetoprotein wurde in drei Reinigungsschritten aus Nabelschnurserum mittels der präparativen Kartonelektrophorese, der Gelfiltration an Sephadex G 200 und der Immunabsorption an Anti-AFP-Antikörper-haltiger Cyano Bromid aktivierter Sepharose 4 B isoliert.

Das Protein erwies sich als immunologisch rein und konnte physiko-chemisch näher charakterisiert werden.

Mit dieser AFP-Fraktion wurden durch Immunisierung von Kaninchen hochtitrige, monospezifische Antiseren gewonnen, die nach Auftrennung in IgG-Fractionen mittels DEAE-Zellulose Anionenaustauscherchromatographie zur Weiterführung des Immunabsorptionsverfahrens und im eigenen Radioimmunoassay verwandt wurden.

Das reine Protein wurde mit ^{125}J markiert und mit dem radioaktiven AFP und seinem homologen Antikörper ein eigener Radioimmunoassay nach der Doppel-Antikörpermethode entwickelt. Die untere Empfindlichkeit dieses sehr gut reproduzierbaren Testes lag bei 5 ng/ml, Inter- und Intra-Kontrollen (zehnfach) wiesen Variationskoeffizienten von 14,6 bzw. 2,0% auf.

Mit Hilfe des eigenen Radioimmunoassay wurden insgesamt 593 Doppelbestimmungen bei Seren von 140 Normalpersonen, 18 Patienten mit PLC, 15 mit sekundären Lebermetastasen, 102 mit Leberzirrhose, 70 mit Hepatitis und von 8 wegen Echinococcusbefall der Leber operierten Patienten durchgeführt.

Gegenüber dem Normalkollektiv (AFP-Spiegel unter 15 ng/ml, 86,4% unter 5 ng/ml) fanden sich höchste pathologische Konzentrationen (über 1000 ng/ml) bei 14/18 Patienten mit primärem Leberzellkarzinom. Transitorische, leichte bis mittelgradige AFP-Konzentrationserhöhungen wurden bei einem Drittel der Einzel- (N=63) und 2/3 der Verlaufsfälle von Patienten mit akuter Hepatitis gefunden. Bei chronischen Hepatitiden zeigte sich ein mehrere Wochen persistierende AFP-Spiegel-erhöhung.

Von 102 Patienten mit Leberzirrhose wiesen 13 leicht bis mittelgradig erhöhte AFP-Werte auf, außerdem gaben bei 3 Patienten mit der Anfangsdiagnose Leberzirrhose höchst pathologische AFP-Konzentrationen (über 1000 ng/ml) die ersten Hinweise auf ein primäres Leberzellkarzinom. Zum Teil excessive transitorische AFP-Spiegelerhöhungen (bis 5600 ng/ml) ergaben sich bei Patienten in den ersten Tagen nach partieller Hepatektomie, was auf einen Zusammenhang zwischen AFP-Synthese und Leberzellregeneration schließen läßt.

Aufgrund der vorgelegten Untersuchungsergebnisse und unter Berücksichtigung der in der Literatur angegebenen Daten läßt sich sagen; α -Fetoprotein ist ein sehr charakteristisches Protein für das primäre Leberzellkarzinom und ist als Parameter für den Therapieerfolg dieses Tumors gut geeignet. Es kann bei benignen Lebererkrankungen Hinweise auf die Zellregenerationslage der Leber geben und seine radioimmunologische Kontrolluntersuchung bei Leberzirrhose-Patienten würde als Suchmethode sehr frühzeitig eine maligne Entartung zum primären Leberzellkarzinom zu erkennen geben.

1. ABELEV, G.I., S.D.PEROVA, N.I.KHRAMKOVA, Z.A.POSTNIKOVA and I.S.IRLIN:
Production of embryonal alpha globulin by transplantable mouse hepatomas.
Transplantation Bull.1: 174 (1963)
2. ABELEV, G.I.:
Antigenic structure of chemically-induced hepatomas.
Prog.Exp.Tumor Res. 7: 104 (1965)
3. ABELEV, G.I., I.V.ASSERCRITOVA, N.A.KRAEVSKY, S.D.PEROVA, N.I.PEREVODCRIKOVA:
Embryonal serum alpha-globulin in cancer patients: diagnostic value.
Int.J.Cancer 2: 551 (1967)
4. ABELEV, G.I.:
Production of embryonal serum alpha-globulin by hepatomas: review of experimental and clinical data.
Cancer Res. 28: 1344 (1968)
5. ABELEV, G.I.:
Alpha-fetoprotein production by normal liver and liver tumors.
H.Peeters (ed) Protides of biological fluids. 18: 203
Pergamon Press Oxford 1971
6. ABELEV, G.I.:
Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors.
Advances in Cancer Res. 14: 295 (1971)
7. ABELEV, G.I.:
Regulation of alpha-fetoprotein synthesis.
Neoplasma 20: 563 (1973)
8. ADILOLFI, A., M.ADILOLFI and S.COHEN:
Isolation and characterization of human foetal alpha-globulin (a1F) from foetal and hepatoma sera.
Biochim.Biophys.Acta 251: 197 (1971)
9. ALPERT, E., P.SCHUR, J.DRYSDALE, K.ISSELBACHER:
Human alpha-a-fetoprotein: purification and physical properties.
Fed.Proc. 30: 246 (1971)

10. ALPERT, E., T.E. STRAZL, P.H. SCHUR, K.J. ISSELBACHER:
Serum alpha-fetoprotein in hepatoma patients after liver transplantation.
Gastroent. 61: 144 (1971)
11. ALPERT, E., R. HERSBURG, P.H. SCHUR, K.J. ISSELBACHER:
Alpha-fetoprotein in human hepatoma: improved detection in serum and quantitative studies using a new sensitive technique.
Gastroent. 61: 137 (1971)
12. ALPERT, E., J.W. DRYSDALE, K.J. ISSELBACHER, P.H. SCHUR:
Human alpha-fetoprotein. Isolation, characterization and demonstration of microheterogeneity.
J. Biol. Chem. 247: 3792 (1972)
13. ALPERT, E., J.W. DRYSDALE and K.J. ISSELBACHER:
Isoelectric focusing of human alpha-fetoprotein: an aid in purification and characterization of microheterogeneity.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 209: 387 (1973)
14. ALPERT, E., and R.L. COSTON:
Evaluation of a rapid Latex-agglutination test for detection of alpha-1-fetoprotein.
Clin. Chem. 19: 1069 (1973)
15. ALPERT, E., R. COSTON, J. PERROTTO:
Immunoenzymatic assay for alpha-fetoprotein.
Lancet I: 526 (1974)
16. ALPERT, E. and R.L. COSTON:
Serum alpha-fetoprotein (AFP) in benign and malignant gastro intestinal diseases: Evaluation of an immunoenzymatic assay.
Clin. Chim. Acta 58: 77 (1975)
17. AMO, T., H. AKIRA, H. OBATA, M. TANNYA:
Lokalisation of alpha-fetoprotein in primary carcinoma of the liver.
V. Congr. Mundo de Gastroent. Cind. de Mexico 13 al 18 de Oct. 1974
18. AXEN, R., J. PORATH, S. ERBACK:
Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halide
Nature, 214: 1302-1304 (1967)

19. AZZOPARDI, A.:
The diagnostic significance of serum alpha-fetoprotein.
Tumori 60: 231 (1974)
20. BELANGER, L., C. SYLVESTRE and D. DUFOUR:
Enzyme-linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures.
Clin.Chim.Acta 48: 15 (1973)
21. BERGSTRAND, C.G., B. CZAR:
Paper electrophoretic study of human fetal serum proteins with demonstration of a new protein fraction.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 9: 277 (1957)
22. BERGSTRAND, C.G.:
Demonstration of a new protein fraction in serum from human fetus.
Scand.I.clin.Lab.Invest. 8: 174 (1956)
23. BERNADES, P.:
Alpha 1 fetoglobulin in primary gastrointestinal cancer other than hepatoma.
Ann.Gastroent.Hepat. 7: 561 (1971)
24. BLOOMER, J.R., T.A. WALDMANN, K.R. MCINTIRE and G. KLATSKIN:
Serum alpha-fetoprotein levels in patients with non-neoplastic liver disease.
Gastroent. 65: (1973)
25. BLOOMER, J.R., T.A. WALDMANN, K.R. MCINTIRE and G. KLATSHIN:
Relationship of serum alpha-fetoprotein to the severity and duration of illness in patients with viral hepatitis.
Gastroent. 68: 342 (1975)
26. BORDE, J., P. MITROFANOFF, M. GROSLEY:
Présence d'alpha-fœtuine dans la régénération hépatique après hépatectomie réglée chez l'enfant.
Ann.Gastroent. Hepatol. 7: 580 (1971)
27. BOREL-GIRAUD, N., M. NYSEN and J. DORCHE:
La recherche de l'alpha-1-fœtoprotéine par immunoélectrophorèse à contre courant sur cellogel.
Clin.Chim.Acta 49: 169 (1973)
28. BURTIN, P., S. von KLEIST, D. BUFTE:
Etude sur les antigènes foetaux humains. I. Etude immunoélectrophorétique des antigènes du sérum foetal humain absents de serum adulte.
Bull.Soc.chim.biol. (Paris) 49: 1389 (1967)

29. CASSUTO, J.P., P.SOUBIRAN, R.MASSEYEFF and DELMONT:
Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein in cases of acute
virale hepatitis.
Digestion 10: 341-342 (1974)
30. CHAYVIALLE, J.A., P.C.GANCULI:
Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein in human plasma.
Lancet I: 1355 (1973)
31. CHAYVIALLE, J.A., C.TOUILLON, C.CROZIER and R.LAMBERT:
Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein in human serum.
X.Clinical value in Patients with liver diseases.
Amer.J.Digest.Dis. 19:1102-1110 (1974)
32. CHU, M.L., W.LIN, T.O.YOSHIDA, S.H.CHU and T.LIN:
Demonstration of alpha-fetoglobulin in hepatoma tissue
by fluorescent antibody technique.
Cancer 34: 268 (1974)
33. CORLIN, R.F., R.K.TOMPKINS:
Serum alpha-fetoprotein in an patient with hepatic me-
tastases from bronchogenic carcinoma.
Amer.J.Digest.Dis. 17: 553 (1972)
34. DELMONT, J., J.KERMARA, J.LAFON, L.BONET, J.P.CASSUTO and
R.MASSEYEFF:
Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein.II.Studies in Pa-
tients Suffering from Hepatic diseases.
Digestion 10:29 (1974)
35. ELGORT, D.A. and G.I.ABELEV:
Immunoautoradiographic determination of alpha-fetoprotein
of animals and man.
Bull.exp.Biol.Med. 2: 118 (1971)
36. ENDO, Y., K.KANAI, S.LINO and T.ODA:
Clinical significance of alpha-fetoprotein with special
reference to primary cancer of the liver.
Gann, Monogr. on Cancer Res. 14: 67 (1973)
37. ENGELHARDT, N.V., L.Ya.SHIPOVA, A.I.GUSEV, A.K.YAZOVA and
E.N.TER-GRIGOROVA:
Observation on the alpha F-globulin in secretions on human
embryo liver and the liver of newborn mice by the fluores-
cent antibody method.
Bull.exp.Biol.Med. (USSR) 68: 62 (1969)

36. ENGELHARDT, N.V., V.S. POLTORANIKA and A.K. YAZOVA:
Localization of alpha-fetoprotein in transplantable
murine teratocarcinomas.
Int.J.Cancer 11: 448 (1973)

39. GALDO, A., J.P. CASADO, R. TALAVERA:
Démonstration dans le sérum du fœtus humain d'une nouvelle
fraction protéique au moyen de l'électrophorèse sur papier.
Arch.Franc.Pediat. 16: 954 (1959)

40. GALLMEIER, W.M. und H.F. OETTGEN:
Tumormmunologie. Virusinduzierte Tumoren.
Dtsch.Med.Wschr. 93: 1114 (1968)

41. GASSNER, M., P.J. GROB:
Alpha-Fetoprotein - diagnostische Bedeutung.
Schw.med.Wschr. 104, 557-564 (1974)

42. GEFFROY, Y., P. DENIS, R. COLIN, F. SAUGER, F. MATRAY, A. FON-
DIMARE:
Présence d'alpha-fœtoprotéine chez l'adulte au cours
~~d'une~~ d'une hépatite virale traitée par corticothérapie.
Presse méd. 78: 1107 (1970)

43. GITLIN, D., M.D. BOESMAN:
Serum-alpha-fetoprotein, albumin and gamma-G-globulin
in the human conceptus.
J.Clin.Invest. 45: 1826 (1966)

44. GITLIN, D., A. PERRICELLI and G. GITLIN:
Synthesis of alpha-fetoprotein by liver, yolk sac and
gastrointestinal tract of the human conceptus.
Cancer Res. 32: 979 (1972)

45. GOUSSEV, A.I., N.V. ENGELHARDT, R. MASSEYEFF, R. CAMAIN and
B. BASTERIS:
Immunofluorescent study of alpha-fetoprotein (alpha fp)
in liver and liver tumours. II. Localization of alpha fp
in the tissues of patients with primary liver cancer (PLC).
Int.J.Cancer 7: 207 (1971)

46. GRABAR, P., C.A. WILLIAMS:
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés elec-
trophorétiques et immunochimiques d'un mélange de pro-
teins. Application du sérum sanguin.
Biochem.Biophys.Acta 10, 193 (1953)

47. GRABAR, P.:
Introductory remarks on foetal proteins and their reappearance in tumors.
Prot.biol.Fluids 18: 201 (1971).
48. GUSEV, A.I., A.K.YAZOVA:
Isolation and purification of embryospecific alpha globulins of the human and animals employing preparative disc electrophoresis in polyacrylamid gels.
biokhimiya: 35: 172 (1970)
49. GUSEV, A.I., A.K.YAZOVA and E.V. POYOKOVA:
A comparison of individual alpha fetoprotein of human fetuses and patients with primary cancer of the liver.
Bull.Exp.Biol.Med. (USSR) 71: 69 (1971)
50. HIERMEYER, E.:
Inaugural Dissertation, München 1976
51. HIJMAN, W., H.R.SCHULT and F.KLEIN:
An immunofluorescent procedure for the detection of intracellular immunoglobulins.
Clin.exp.Immunol. 4: 457 (1969)
52. HIRAI, H., S.NISHI and H. WATABE:
Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein.
J.Nucl.Med. 13: 783 (1973)
53. HIRAI, H., S.NISHI, H.WATABE and Y.TSUKADA:
Some chemical, experimental and clinical investigations of alpha-fetoprotein.
Gann Monogr. on Cancer Res. 14: 19 (1973)
54. HIRZFELD, L., W.HALBER, J.LASKOWSKI:
Untersuchungen über die serologischen Eigenschaften der Gewebe.II. Über serologische Eigenschaften der Neubildungen.
Z.Immun.Forsch.exp.Ther. 64: 81 (1929)
55. HIRZFELD, L., W.HALBER, J.ROSENBLAT:
Untersuchungen über Verwandtschaftsreaktionen zwischen Embryonal- und Krebsgewebe.II.Vorläufige Mitteilung: Menschenembryo und Menschen-Krebs.
Z.Immun.Forsch.Allerg.Klin.Immunol. 75: 209 (1932)
56. HUNTER, W.M.:
Radioimmunoassay
Handbook of experimental Immunology, 2nd ed., chapt.17.
Oxford 1973

57. ISHIGURO, T. and T. NISHIMURA:
Radioimmunoassay of maternal serum alpha-fetoprotein associated with pregnancy.
Amer. J. Obst. Gyn. 116: 27 (1973)
58. ISHII, M.:
Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein.
Gann Monogr. on Cancer Res. 14: 89 (1973)
59. JOHANSSON, S. B.:
A radioimmunoassay for serum alpha-fetoprotein based on commercial antisera.
Lancet, II, 7884 : 839
60. JONSSON, S. and G. KORNVALL:
The use of protein A-containing *Staphylococcus aureus* as a solid phase anti-IgG reagent in radioimmunoassay as exemplified in the quantitation of alpha-fetoprotein in normal human adult serum.
Europ. J. Immunol. 4: 29 (1974)
61. KAGEDAL, L., S. AKERSTRÖM:
Covalent binding of proteins to polysaccharids by cyanogen bromide and organic cyanates. I. Preparation of soluble glycine-, insulin and ampicillin-dextran.
Acta Chem. Scand. 25: 1855-1859 (1971)
62. KARVOUNTZIS, G. G. and A. G. REDEKER:
Alpha-fetoprotein (AFP) as an index of liver regeneration in severe hepatitis (Abstr.)
Digestion 8: (1973)
63. KARVOUNTZIS, G. G. and A. G. REDEKER:
Relation of alpha-fetoprotein in acute hepatitis to severity and prognosis.
Ann. Int. Med. 80: 156 (1974)
64. KASAI, Y., M. MITO, J. UCHINO, S. CHIRA, A. KAWANURA, K. SASAKI, A. MIGAKAWA:
Alpha-fetoprotein in the treatment of primary liver cancer
Jap. J. of Surgery, Vol. 3, No. 2, 73-79 (1973)
65. KAWATA, H., Y. SHIMIZU, G. KOJIMA, T. TANIGUCHI, S. NISHIYAMA:
Retrospective study on the evaluation of diagnostic procedure for hepatoma in patients with cirrhosis of the liver.
Acta Hepatogastroent. 21: 106 (1974)

66. KELLEHER, J., Sister COLUM, C. DOYLE, T. HEMESSY and M. J. WHELTON:
Alpha fetoprotein in metastatic gastric carcinoma.
Gut 15: 401 (1974)
67. KEW, M. C., L. R. PURVES and I. BERSON:
Serum alpha-fetoprotein levels in acute viral hepatitis.
Gut 14: 939 (1973)
68. KHRAMKOVA, N. I. and V. I. GUELSTEIN:
Antigenic structure of mouse hepatomas. V. Organospecific liver antigens and embryonic alpha-globulin in hepatoma of mice induced with orthoaminoazotoluene (AAT).
Neoplasma 12: 239 (1965)
69. KITHIER, K., J. HOUSTEK, J. MASOPUST and J. RADL:
Occurrence of a specific foetal protein in a primary liver carcinoma.
Nature (London) 212: 414 (1966)
70. KITHIER, K., M. AL-SARRAF, J. BELAMARIC, J. RADL, Z. VALENTA, V. ZIZKOVSKY and J. MASOPUST:
Alpha-fetoprotein in bovine hepatocellular carcinoma.
J. Comp. Pathol. 84: 133 (1974)
71. KNEDEL, I. und F. SPERL:
Über ein präparatives Elektrophorese-Verfahren mit Kartonpapier als Trägermaterial.
Blut, Bd. V, Heft 2, 65-90 (1959)
72. KNEDEL, M., A. FATEH-MOGHADAM:
Die Gradientenelutionschromatographie.
GIT, 10 675-684 (1965)
73. KNEDEL, M., A. FATEH-MOGHADAM:
Säulenchromatographische Untersuchungen von Paraproteinen an Ionenaustauschern.
Klin. Wschr. 46, 1078-1092 (1968)
74. KOHN, J.:
Method for the detection and identification of alpha-fetoprotein in serum.
J. Clin. Pathol. 23: 733 (1970)
75. KOHN, J.:
Alpha₁-fetoprotein: Laborbestimmung und klinische Bedeutung.
Ärztl. Lab. 18: 307 (1972)

76. KOHN, J., P.C.WEAVER:
Serum-alpha-1-fetoprotein in hepatocellular Carcinom.
Lancet II: 334-336 (1974).
77. KOLDOVSKY, P.:
Tumor specific transplantation antigen.
Recent Results in Cancer Research Nr.22
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-N.York 1969
78. KUROYANAGI, Y.:
Results in the treatment of hepatocellular carcinoms
with special reference to alpha-fetoprotein.
Gann Monogr. on Cancer Res. 14: 107 (1973)
79. LAFON, J., C.BONET, R.MASSEYEFF and J.DELMONT:
Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein in metastatic
liver cancer (Abstr.)
Digestion 8: (1973)
80. LAMERZ, R. und A.FATEH-MOGHADAM:
Radioimmunologische Bestimmungen von Immunglobulin E.
Klin.Wschr. 52: 18-23 (1974)
81. LAMERZ, R., A.FATEH-MOGHADAM und M.KNEDEL:
Zur quantitativen immunologischen Bestimmung von Serum-
protein.
Z.klin.chem.klin.Biochemie, 11: 491-500 (1974)
82. LAMERZ, R. und A.FATEH-MOGHADAM:
Carcinofetale Antigene, I. Alpha-Fetoprotein.
Klin.Wschr. 53, 147-169 (1975)
83. LAMERZ, R., J.GRUNST, A.FATEH-MOGHADAM, U.SCHMALHORST,
J.EISENBURG, H.PICHLMAIER:
Serum-Alpha-Fetoprotein-Veränderungen nach partieller He-
patektomie beim Menschen.
Klin.Wschr. 53, 147-169 (1975)
84. LEHMANN, F.G.:
Kristallisation von Alpha-Fetoprotein aus dem Plasma
eines Patienten mit primärem Leberzellcarcinom.
Klin.Wschr. 49: 609 (1971)
85. LEHMANN, F.G., D.LEHMANN:
Isolierung und Kristallisation von Alpha-1-Fetoprotein
aus einem primären Leberzellkarzinom.
Z.klin.Chem. u.klin.Biochem. 9: 309 (1971)

86. LEHMANN, F.G., D. LEHMANN, G.A. MARTINI:
Alpha 1-fetoprotein in liver diseases.
Digestion 6: 249 (1972)
87. LEHMANN, F.G. und D. LEHMANN:
Neue immunologische Techniken und quantitative Bestimmung
von Alpha 1 Foetoproteinen in der Tumordiagnostik.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 78: 841 (1972)
88. LEHMANN, F.G., D. LEHMANN and G.A. MARTINI:
Passive haemagglutination of alpha 1-fetoprotein: prospective study in liver cirrhosis. (Abstr.)
Digestion 8: (1973)
89. LEHMANN, F.G. und D. LEHMANN:
Vergleich verschiedener Methoden zum serologischen Nachweis von Alpha 1-Foetoprotein im Serum.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11: 339 (1973)
90. LEHMANN, F.G.:
Epidemiologie und Diagnostik des primären Leberzellcarcinoms.
Internist 14: 274 (1973)
91. LEHMANN, F.G., D. LEHMANN und G.A. MARTINI:
Empfindlicher Nachweis von Alpha 1-Foetoprotein im Serum durch passive Hämagglutination.
Klin. Wschr. 52: 216 (1974)
92. LEHMANN, F.G. und D. LEHMANN:
Alpha 1-Foetoprotein in malignen Tumoren.
Klin. Wschr. 52: 222 (1974)
93. LEHMANN, F.G. und G.A. MARTINI:
Zur Häufigkeit hepatozellulärer Carzinome bei Leberzirrhose.
81. Intern. Kongr. Wiesbaden (1975)
94. LINDER, E., M. SEPPÄLÄ:
Localization of the alpha-fetoprotein in the human fetus and placenta.
Acta path. microbiol. scand. 73: 565 (1968)
95. MAC SWEEN, R.N.:
A clinicopathological review of 100 cases of primary malignant tumors of the liver.
J. Clin. Pathol. 27: 669-682 (1974)

96. MANCINI, G., A.O. CARBONARA, J.F. HEREMANS:
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry 2, 235 (1965)
97. MASOPIST, J. and L. KOTAL:
Fetoprotein: Immunochemical behaviour of an autonomous fetal component in sera from human fetuses.
Ann. paediat. (Basel) 204: 138 (1965)
98. MASOPIST, J., K. KITHIER, J. RADL, J. KOUTECKY and L. KOTAL:
Occurrence of fetoprotein in patients with neoplasms and non-neoplastic diseases.
Int. J. Cancer 3: 364 (1968)
99. MASOPIST, J., H. TOMASOVA and L. KOTAL:
Some physicochemical characteristics of human alpha 1-fetoprotein.
Prot. biol. Fluids 18: 37 (1971)
100. MASSEYEFF, R., M. SANKALE, M. ONDE, A. MENYE, R. CAMAIN, C. QUE-
NUM, L. MAYDAT, P. MATTERN, P. ANCELLE et L. LEBLANC:
Valeur de la recherche de l'alpha-1-fetoprotéin sé-
rique pur le diagnostic du cancer primitif du foie.
Bull. Soc. med. Afr. noire Langue franç. 13: 537 (1968)
101. MASSEYEFF, R.:
Human alpha-fetoprotein.
Pathol. Biol. 20: 703 (1972)
102. MASSEYEFF, R. F.:
Factors influencing alpha-fetoprotein biosynthesis in patients with primary liver cancer and other diseases.
Gann Monogr. on Cancer Res. 14: 3 (1973)
103. MASSEYEFF, R., C. BONET, J. DRONET, P. SUDAKA and C. LALANNE:
Radioimmunoassay of alpha-Fetoprotein.
I. Technique and Serum Levels in the normal Adult.
Digestion, 10: 17 (1974)
104. MASSEYEFF, R., J. GILLI, B. KREBS, C. BONET and H. ZRIHEN:
Radioimmunoassay of alpha-Fetoprotein. V. Influence of age on the physiological serum alpha-Fetoin level in man and in rat.
Biomed. 21: 353 (1974)

105. MASSEYEFF, R., J.F.FREY, J.P.CASSUTO, B.KREBS, J.DELMONT:
Radioimmunoassay of alpha fetoprotein in gastrointestinal diseases.
Lancet II: 461-462 (1974)
106. MATRAY, F., F.SAUGER, J.BORDE, P.MITROFANOFF, M.GROSLEY
M.BOURG, R.LAUMONIER et J.HEMET:
Présence d'alpha-foetoprotéin au cours d'une régénération
hépatique après hépatectomie gauche pour hépatom chez
un enfant.
Path.Biol. 20: 353 (1972)
107. MAWAS, C., D.BUFFE, J.LEMMERLE, O.SCHWEISGUTH, P.BURTIN:
Recherche immunologique de l'alpha 1-foeto-protéine on
fœtuine dans les tumeurs primitives du foie et les té-
ratomes malins de l'enfant.(A propos de 18 cas positifs).
Arch.franç.Pédiat. 26: 779 (1969)
108. MAWAS, C., M.KOHEN, J.LEMMERLE, D.BUFFE, O.SCHWEISGUTH
and P.BURTIN:
Serum alpha -1-foetoprotein (fetuin) in children with
malignant ovarian or testicular teratomas.Preliminary
results.
Int.J.Cancer 4: 76 (1969)
109. MAWAS, C., D.BUFFE, O.SCHWEISGUTH and P.BURTIN:
Alpha 1-foetoprotein and childrens's cancer.
Rev.Europ.Clin.Biol. 16: 430 (1971)
110. Mc INTIRE, K.R., T.A.WALDMANN, C.G.MOERTEL and V.L.GO:
Serum alpha-fetoprotein in patients with neoplasms of the
gastrointestinal tract.
Cancer Res. 35: 991 (1975)
111. MESHKINPOUR, H., A.T.WEPSIE, W.R.SCHMALHORST:
Alpha-1-fetoprotein and Alcoholic Hepatitis.
Amer.J.of Digestiv Diseases, Vol.19, 8:709 (1974)
112. MILLER, A.I., M.D.MORAL and B.R.SCHIFT:
Presence of alpha-1-fetoprotein in alcoholic hepatitis.
Gastroent. 68: 381 (1975)
113. MORGAN, C.G., R.L.SORENSEN, A.LAZAROW:
Studies of an inhibitor of the two antibody immunoassay
System.
Diabetes 13:1 (1964)

114. NISHI, S. and H. HIRAI:
Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein in hepatoma, other liver diseases and pregnancy.
Gann Monogr. on Cancer Res. 14: 79 (1973)
115. NISHI, S. and H. HIRAI:
Purification and chemical characterization of human alpha-fetoprotein.
Prot. Biol. Fluids 18: 43 (1971)
116. NISHI, S.:
Isolation and characterization of a human fetal alpha-globulin from the sera of fetuses and a hepatoma patient.
Cancer Res. 30: 2507 (1970)
117. NISHI, S., H. HIRAI:
Purification of human, dog and rabbit alpha-fetoprotein by immunoadsorbents of Sepharose coupled with anti-human alpha-fetoprotein.
118. NISHI, S., H. WATABE, H. HIRAI:
Production of antibody to homologous alpha fetoprotein in rabbits, rats and horses by immunization with human alpha-fetoprotein.
J. Immunol. 109: 957 (1972)
119. NISHIOKA, M., T. IBATA, K. MIYAZATO, K. OKITA and T. FUJITA:
Utilization of solubility of alpha-fetoprotein in 34 % ammonium sulfate in the preparation of antiserum and its test.
Digestion 4: 65 (1971)
120. NISHIOKA, M., T. IBATA, K. OKITA, T. HARADA and T. FUJITA:
Localization of alpha-fetoprotein in hepatoma tissues by immunofluorescence.
Cancer Res. 32: 162 (1972)
121. NISHIOKA, M., T. IBAKA, K. MYAZATO, K. OKITA, K. HIRONAGA and T. FUJITA:
Immunofluorescence studies on alpha-fetoprotein in hepatoma tissue.
Gann Monogr. on Cancer Res. 14: 205 (1973)
122. NORGAARD-PEDERSEN, B.:
Purification and sensitive immunoelectrophoretical detection and quantitation of human alpha 1-fetoprotein.
Clin. Chim. Acta 38: 163 (1972)

123. NORGAARD-PEDERSEN, B.:
A highly sensitive radioimmuno-electrophoretic quantitation of human alpha-fetoprotein.
Clin.Chim.Acta 48: 345 (1973)
124. NORGAARD-PEDERSEN, B.:
Alpha-fetoprotein concentration in cord serum as a parameter for gestational age.
Acta paed. Scand. 62: 167 (1973)
125. NUNEZ, E., F.ENGELMANN, G.BENASSAY, M.F.JAYLE:
Identification et purification préliminaire de la foetoprotéine liant les oestrogènes dans le rats nouveau-nés.
C.R.Acad.Sci. Paris 273: 242 (1971)
126. OKAMOTO, Y:
Studies on alpha-fetoprotein. III. An investigation on alpha-fetoprotein production in gastric cancer with and without liver metastasis.
Jap.J.Gastroent. 71: 1271-1280 (1974)
127. OLOVNIKOV, A.M., V.S.TSVETKOV:
Detection of the embryonal alpha-globulin by the method of aggregate-haemagglutination in the sera of patients with certain forms of human cancer.
128. OUCHTERLONY, Ö.:
Diffusion in gel methods for immunological analysis.
Progress in Allergy 5: 1 (1958)
129. OUCHTERLONY, Ö.:
Diffusion in gel methods for immunological analysis II.
Progress in Allergy 7: 30 (1962)
130. PASTERNAK, G.:
Immunologie des Krebses. Grundlegende Experimente und klinische Fortschritte.
Arch.Geschw. Forsch. 42: 345 (1973)
131. PECEC, M. and N.VOICULETZ:
An antibody sandwich method for the radioimmunoassay of human alpha-fetoprotein.
Immunochem. 11: 771 (1974)
132. PEDERSEN, K.O.:
Fetuin, a new globulin isolated from serum.
Nature (London) 154: 575 (1944)

133. PETERSON, E.A. and H.A. SOBER:
Chromatographie of proteins, I Cellulose ion-exchange
adsorbents.
J. Amer. chem. Soc. 78, 751 (1956)
134. PETERSON, E.A.:
Cellulosic ion exchangers. Laboratory techniques in Bio-
chemistry and Molecular Biology.
Vol. 2, Part II, 228 ff (1970)
135. PIERCE, G.B.:
Differentiation of normal and malignant cells.
Fed. Proc. 29: 1248 (1970)
136. PURTILO, D.T., E.J. YUNIS:
Alpha-fetoprotein its immunofluorescent localization in
human fetal liver and hepatoma.
Lab. Invest. 25: 291 (1971)
137. PURVES, L.R. and I. BERSOHN:
Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein.
Proc. Sth. Afr. Ass. Path. 7: 67 (1969)
138. PURVES, L.R., E. van der MERWE and I. BERSOHN:
Serum alpha-fetoprotein. V. The bulk preparation and some
properties of alpha-fetoprotein obtained from patients
with primary cancer of the liver.
S. Afr. J. Med. 44: 1264 (1970)
139. PURVES, L.R. and M. PURVES:
Serum Alpha-fetoprotein. VI. The radioimmunoassay. Evi-
dence for the presence of alpha-fetoprotein in the serum
of normal people and during pregnancy.
S. Afr. Med. J. 46: 1290 (1972)
140. PURVES, L.R., W.R. BRANCH, E.W. GEDDES, C. MANSO and M. POR-
TUGAL:
Serum alpha-fetoprotein. VII. The range of apparant serum
values in normal people, pregnant women, and primary liver
cancer high risk populations.
Cancer 31: 576 (1973)
141. PURVES, L.R.:
Primary liver cancer in man as a possible short duration
seasonal cancer.
S. Afr. J. Sci. 69: 173 (1973)

142. RAPP,W., H.E.LEHMANN:
Nachweis des Alpha₁-Fötoprotein in menschlichem Tumorsarciten und seine partielle Isolierung.
Clin.Chim.Acta 31: 45 (1971)

143. RICHTER,J., OHLEN,J.:
Serumkonzentrationen von Alpha-1-Fetoprotein im Verlauf Australia-Antigen-positiver und -negativer Hepatitis.
81.Intern.Kongr. Wiesbaden (1975)

144. RIOCHE,M., S.QUELIN, I.AECK, M.JACQUESSON, B.BASTERIS, R.MASSEYEFF:
Culture in vitro de cellules de cancer primitif de foie humain.
C.R.Acad.Sci. (Paris) 271: 1148 (1970)

145. RODBARD,D., W.BRIDSON, P.L. RAYFORD:
Rapid calculation of radioimmunoassay results.
J.Lab.clin.Med. 74: 770 (1969)

146. ROSTOCK,K.J. und R.CLAUS:
Primäre Leberkarzinome - eine klinische Studie.
Dtsch.Z.Verda.u.Stoffwechselerkr. 33: 193-198 (1973)

147. RUOSLAHTI,E. and M.DEPPÄLÄ:
Studies of carcino-fetal proteins:I.Physical and chemical properties of human alpha-fetoprotein.
Int.Cancer 7: 218 (1971)

148. RUOSLAHTI,E., M.SEPPÄLÄ, h.PIHKO and P.VUOPIO:
Studies of carcino-fetal proteins. II. Biochemical comparison of alpha-fetoprotein from human fetuses and patients with hepatocellular cancer.
Int.J.Cancer 8: 283 (1971)

149. RUOSLAHTI,E., M.SEPPÄLÄ:
Studies of carcino-fetal proteins.III.Development of a radioimmunoassay for alpha-fetoprotein. Demonstration of alpha-fetoprotein in serum of healthy human adults.
Int.J.Cancer 8: 374 (1971)

150. RUOSLAHTI,E., B.PIHKO, M.SEPPÄLÄ and P. VUOPIO:
A comparative study of alpha-fetoprotein from fetuses and patients with hepato-cellular cancer.
Scand.J.clin.Lab.Invest. 27 Suppl. 116: 57 (1971)

151. RUOSLAHTI, E., M. SEPPÄLÄ, P. VUOPIO, E. SAKSELA and P. PELTO-KALLIO:
Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein in primary and secondary cancer of the liver.
J. Nat. Cancer Inst. 49: 623 (1972)
152. RUOSLAHTI, E. and M. SEPPÄLÄ:
Alpha-fetoprotein in normal serum.
Nature New Biol. (London) 235: 161 (1972)
153. RUOSLAHTI, E., M. SEPPÄLÄ, J. A. RÄSÄNEN, P. VUOPIO and T. HELSKE:
Alpha-fetoprotein and hepatitis B antigen acute hepatitis and primary cancer of the liver.
Scand. J. Gastroent. 8: 197 (1973)
154. RUOSLAHTI, E. and M. SEPPÄLÄ:
Properties and occurrence of alpha fetoprotein in serum of healthy adults and patients with hepatitis and cancer of the liver.
Embryonic and fetal antigens in cancer 2: 351-354 (1972)
155. RUOSLAHTI, E., M. SALASPURO, H. PIKKO, L. ANDERSON, M. SEPPÄLÄ:
Serum-alpha-Fetoprotein: Diagnostic Significance in Liver Disease.
Brit. Med. J. 2: 572 (1974)
156. SASAKI, K., A. MIYAKAWA, M. MITO and Y. KASAI:
Histology of hepatoma in man with regard to alpha-fetoprotein.
Gann monogr. on Cancer Res. 14: 199 (1973)
157. SCHEIDEGGER, J. J.:
Une micromethode de l'immuno-electrophorese.
Int. Arch. Allergy 7: 105 (1955)
158. SELL, S., M. NICHOLS, F. F. BECKER and H. L. LEFFERT:
Hepatocyte proliferation and Alpha 1-fetoprotein in pregnant, neonatal, and partially hepatectomized rats. (Abstr.)
Cancer Res. 34: 665 (1974)
159. SEPPÄLÄ, M., T. TALLBERG and C. EHNHOLM:
Studies on embryo-specific protein. Physiological characteristics of embryo-specific alpha-globulin.
Ann. Med. Exp. Fenn. 45: 16 (1967)

160. SEPPÄLÄ, M. and E. RUOSLAHTI:
Radioimmunoassay of maternal serum alpha-fetoprotein during pregnancy and delivery.
Am.J.Obstet.Gynec. 112:208 (1972)
161. SHEH ADEH-SHARAYA, A.I.:
Das primäre Leberzellkarzinom.
Inaugural-Dissertation München 1973
162. SHIBATA, K., Y. TERANO and H. ICHIHASHI:
More sensitive quantitation of low level serum IgE and alpha 1-fetoprotein by single radial immunodiffusion using radiiodine labeled IgE or alpha 1-fetoprotein as marker.
Zschr. Imm.Forschg. 146: 71 (1973)
163. SILVER, H.K., J. DENEBAULT, W.G. THOMPSON, J. SHUSTER and S.O. FREEMAN:
The detection of alpha 1-fetoprotein in patients with viral hepatitis.
Cancer Res. 34: 244 (1974)
164. SILVER, H.K., P. GOLD, J. SHUSTER, N.B. JAVITT, S.O. FREEDMAN, N.D. FINLAYSON:
Alpha-1-fetoprotein in chronic liver diseases.
New Engl.J.Med. Vol. 2 1 : 506 (1974)
165. SIZARET, P.P., K.R. Mc INTIRE and G.L. PRINGLER:
Quantitation of human alpha-fetoprotein by electroimmunodiffusion.
Cancer Res. 31: 1399 (1971)
166. SLADE, B.:
Antibodies to alpha-fetoprotein cause foetal mortality in rabbits.
Nature (London) 246: 493 (1973)
167. SMITH, C.J. and P.C. KELLEHER:
Alpha 1-fetoprotein: Separation of two molecular variants by affinity chromatography with concanavalin A-garose.
Biochem.Biophys.Acta 317: 231 (1973)
168. SMITH, J.A., T.I. FRANCIS, G.M. EDINGTON and A.O. WILLIAMS:
Immunofluorescent localization of human alpha-fetoprotein and neonatal livers and cultured cells from hepatocellular carcinoma.

169. SMITH, J.B. and D.TODD:
Foetoglobulin and primary cancer.
Lancet II: 833 (1968)
170. SMITH, J.B.:
Alpha-fetoprotein in neoplastic and non-neoplastic conditions.
N.Anderson and I.Coggin (ed.) Proc.First Conf.and Workshop on Embryon and Fetal antigens and Cancer.
Div.Techn.Inform.Extens.(Atom.Ener.Com.).
Oak Ridge, Tennessee, USA 1971
171. SMITH, J.B. and L.F.BARKER:
Alpha-fetoprotein and liver specific antigen in viral hepatitis type B.
Arch.Intern.Med. 133: 437 (1974)
172. SMITH, J.B.:
Dynamics of Alpha-fetoprotein (AFP) synthesis in non-neoplastic hepatic disorders.
Clin.Res. 19: 739 (1971)
173. STANISLAWSKI-BIRENCWJG, M., J.URIEL, P.GRABAR:
Association of embryonic antigens with experimentally induce hepatic Lesions in the rat.
Cancer Res. 27: 1990 (1967)
174. SUGAHARA, K., A.KASHII, H.KOGURE:
Serum alpha fetoprotein and resection of primary hepatic cancer.
Arch.Surg. 106: 63 (1973)
175. SUNG, J.L. and Y.F.LIAW:
Hepatitis B antigen and alpha-fetoprotein in hepatoma.
VI.Meeting intern.Ass.for the study of the liver
Acapulco, Mexico, Oct. 20-22 (1974)
176. TATARINOV, Y.S.:
Detection of embryospecific alpha-globulin in the blood sera of patients with primary liver cancer.
Vop.Med.Khim. 10: 90 (1964)
177. TATARINOV, Y.S.:
Immunochemical and electrophoretic characteristics of embryospecific globulins of human blood serum in fetus.
Vop.Med.Khim. 13: 37 (1967)

178. TSUNG,S.H.:
Alpha-fetoprotein in lung cancer metastatic to the liver.
Arch.Pathol. 99: 267 (1975)
- 178a TONAMI,N., T.ABURANO, K.HISIDA:
Comparison of alpha 1-fetoprotein radioimmunoassay method
and liver scanning for detection primary hepatic cell
carcinoma.
Cancer 36: 466 (1975)
179. URIEL,J.:
Transitory liver antigens and primary hepatoma in man and
rat.
Pathol.Biol. 17: 877 (1969)
180. URIEL,J.:
Transitory liver antigens and primary hepatoma.
Prot.Biol.Fluids 18: 211 (1970)
181. URIEL,J., N.RUBIO et F. LOISILLIER:
Localization intracellulaire de l'alpha-foetoprotéin
du foie de rat à l'aide d'estrogènes tritiés.
C.R.Acad.Sci.Ser. D (Paris) 275: 1941 (1972)
182. URIEL,J., C.AUSSEL, D.BOULLION, B. de NECHAUD, F.LOISILLIER:
Localization of rat liver alpha-fetoprotein by cell
affinity. Labelled with tritiated oestrogens.
Nature New Biol. 244: 190 (1973)
183. URIEL,J., B.de NECHAUD and M.DUPIERS:
Oestrogen-binding properties of rat₄ mous an human
fetospecific proteins.
Demonstration by immunoautoradiographic methods.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 46: 1175 (1972)
184. URIEL,J., F.LOISILLIER, A.M.SZEKELY and H.BISMUTH:
Autoradiographic localization of intracellular alpha-fe-
toprotein in primary liver cancer in man.
Biomed. 21: 21 (1974)
185. VIERUCCI,A., A.R.GENAZZANI, A.MESSINA, P.FIORETTI:
Heterogeneity and distribution of human serum fpetopro-
teins and character of the respective antibodies.
Exerpt. Med.Internat.Congr.series 183,Milan,p.57 (1968)

186. WALDMANN, T.A. and K.R. MC INTIRE:
The use of a radioimmunoassay for alpha-fetoprotein
in the diagnostic of malignancy.
Cancer Suppl. 34: 1510 (1974)
187. WATABE, H., H. HIRAI and R. SATOH:
Alpha-fetoprotein in rats transplanted with ascites
hepatoma.
Gann (Tokio) 63: 189 (1972)
188. WEICHSELBAUM, T.E.:
An accurate and rapid method for the determination of
protein in small amounts of blood serum and plasma.
Am.J.Clin.Pathol. 10: 40 (1946)
189. WOODFIELD, D.G., Y. ENDO and T. MATSUHASHI:
Primary liver cancer, alpha 1 fetoprotein and hepatitis B
Antigen in Papua - New Guinea.
Austr. New Zeal. J. Med. 4: 3-7 (1974)

9. Lebenslauf

Am 15.8.1945 wurde ich als 7. von acht Kindern der Eheleute Pfarrer Christian Schmalhorst und Frau Margarete, geb. Stolte in Bielefeld geboren. Nach der Schulzeit in Büren (Westf.) und Höxter/Weser legte ich am 22.2.1965 am König-Wilhelm-Gymnasium in Höxter die Reifeprüfung ab.

An der kirchlichen Hochschule in Bethel bei Bielefeld und den Universitäten Tübingen, München und Münster studierte ich vom SS 65 bis SS 70 evangelische Theologie. Vor der Ev.Theol.Fakultät der Universität Münster bestand ich am 16.7.1970 das Fakultätsexamen.

Vom WS 70/71 bis SS 76 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Humanmedizin, famulierte nach dem Physikum (WS 72/73) im Krankenhaus München Schwabing und im Nervenkrankenhaus Kaufbeuren und schloß am 16.6.1976 das Studium mit dem Staatsexamen und der Note "sehr gut" ab.

